

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**TERAPIA GÉNICA *IN UTERO* PARA
LA CORRECCIÓN DE
ENFERMEDADES HEMATOPOYÉTICAS
HEREDITARIAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Eugenia Alonso Ferrero

Bajo la dirección de los doctores:

**José Carlos Segovia Sanz
Juan A. Bueren Roncero**

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-3372-3



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TERAPIA GÉNICA *IN UTERO* PARA
LA CORRECCIÓN DE
ENFERMEDADES HEMATOPOYÉTICAS
HEREDITARIAS**

María Eugenia Alonso Ferrero
TESIS DOCTORAL
MADRID, 2009



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TERAPIA GÉNICA *IN UTERO* PARA LA CORRECCIÓN DE ENFERMEDADES HEMATOPOYÉTICAS HEREDITARIAS

Memoria presentada por **MARÍA EUGENIA ALONSO FERRERO** para optar al grado de doctor europeus por la Universidad Complutense de Madrid.

Directores de tesis:

Jose Carlos Segovia Sanz

Juan A. Bueren Roncero

María Eugenia Alonso Ferrero
TESIS DOCTORAL
MADRID, 2009

TERAPIA GÉNICA *IN UTERO* PARA LA CORRECCIÓN DE ENFERMEDADES HEMATOPOYÉTICAS HEREDITARIAS

Jose Carlos Segovia Sanz, Jefe de la Unidad de Diferenciación y Citometría de la División de Hematopoyesis y Terapia Génica del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas y **Juan A. Bueren Roncero**, Jefe de la División de Hematopoyesis y Terapia Génica del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, certifican que la memoria adjunta, titulada “TERAPIA GÉNICA *IN UTERO* PARA LA CORRECCIÓN DE ENFERMEDADES HEMATOPOYÉTICAS HEREDITARIAS” ha sido realizada por la licenciada María Eugenia Alonso Ferrero bajo la dirección de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Jose Carlos Segovia Sanz

Juan A. Bueren Roncero

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en la División de Hematopoyesis y Terapia Génica del CIEMAT y del centro CIBER de Enfermedades Raras del Instituto de Salud Carlos III y con la colaboración del Proyecto CONSERT del programa de Salud de la Unión Europea, de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y de la Fundación Marcelino Botín para la transferencia de tecnología en el campo de la Terapia Génica.

María Eugenia Alonso Ferrero ha disfrutado de una beca predoctoral y de un contrato de investigación concedidos por la Fundación Marcelino Botín.

ABREVIATURAS

ADA-SCID	Inmunodeficiencia severa combinada con deficiencia en adenosina d esaminasa (<i>adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency</i>).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN copia.
AF	Anemia de Fanconi.
AF-D1	Anemia de Fanconi D1.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
ATCC	Colección americana de líneas celulares (<i>American Type Culture Collection</i>).
CFU	Unidad formadora de colonias.
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulo-macrofágicas.
CMH	Células madre hematopoyéticas.
CMV	Citomegalovirus (<i>Cytomegalovirus</i>).
DEB	Diepoxibutano.
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.
DPK	Deficiencia en Piruvato Kinasa.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGFP	Proteína verde fluorescente potenciada (<i>enhanced green fluorescent protein</i>).
EICH	Enfermedad injerto contra huésped.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>).
FANCA	Gen humano de Anemia de Fanconi A.
FANCC	Gen humano de Anemia de Fanconi C.
FBS	Suero fetal bovino.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
h	Horas.
HLA	Antígenos leucoc itarios humanos (<i>Human leukocyte antigen</i>).
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma (<i>Internal ribosome entry site</i>).
IMDM	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Iscove.
IP	Yoduro de propidio.
IUHCT	Trasplante <i>in utero</i> de células hematopoyéticas (<i>in utero hematopoietic cell transplantation</i>)

IUHSCT	Trasplante <i>in utero</i> de células madre hematopoyéticas (<i>in utero hematopoietic stem cell transplantation</i>).
IUT	Trasplante <i>in utero</i> (<i>in utero transplantation</i>).
Lin ⁻	Células linaje negativas.
LMPP	Precusores primitivos linfo-mieloides (<i>lymphoid-primed multipotent progenitors</i>).
LT-HSC	Células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a largo plazo (<i>Long-term hematopoietic stem cells</i>).
LTRs	Secuencias repetidas largas de los extremos (<i>Long Terminal Repeats</i>).
LV	Vectores lentivirales.
Min	Minutos.
MMC	Mitomicina C.
MLV	Virus de la leucemia murina (<i>Murine Leukemia Virus</i>).
MO	Médula ósea.
MOI	Multiplicidad de infección (<i>Multiplicity of infection</i>).
nM	Nanomolar.
ORF	Marco abierto de lectura (<i>open reading frame</i>).
pb	Pares de bases.
PBS	Solución salina tamponada con fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PE	Ficoeritrina.
PHA	Fitohemaglutinina (<i>Phytohaemagglutinin</i>).
pre	Elementos reguladores post-transcripcionales (<i>Post-transcriptional regulatory elements</i>).
Q-PCR	PCR cuantitativa o a tiempo real.
RN	Retronectina.
rpm	Revoluciones por minuto.
RV	Vectores Gammaretrovirales.
Seg	Segundos.
SP	Sangre periférica.
SRCs	Células repobladoras de NOD/SCID .
ST-HSC	Células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a corto plazo (<i>short-term hematopoietic stem cells</i>).
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana (<i>Human immunodeficiency virus, HIV</i>).

VSV-G	Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (<i>Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G</i>).
X1-SCID	Inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X.

ÍNDICE

I. SUMMARY	1
II. INTRODUCCIÓN	7
1. EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO	7
1.1. Descripción del sistema hematopoyético	7
1.2. Ontogenia del sistema hematopoyético	12
2. TERAPIA GÉNICA DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO	15
2.1. Vectores utilizados en terapia génica	16
2.2. Protocolos clínicos de terapia génica	23
3. DIAGNÓSTICO PRENATAL DE ENFERMEDADES GENÉTICAS	25
4. TERAPIA PRENATAL DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO	27
4.1. Terapia celular	27
4.1.1. Fuentes de células utilizadas en terapia prenatal	27
4.1.2. Trasplante <i>in utero</i> de células hematopoyéticas (IUHCT)	30
4.2. Terapia génica <i>ex vivo</i>	31
4.3. Terapia génica <i>in vivo</i>	33
4.4. Principales riesgos asociados a la terapia prenatal	34
4.4.1. Riesgo fetal y materno	34
4.4.2. Riesgos asociados a la terapia génica fetal	35
5. ENFERMEDADES GENÉTICAS QUE PUEDEN TRATARSE MEDIANTE TERAPIA PRENATAL	36
5.1. Experiencia clínica en trasplantes <i>in utero</i> (IUT)	38
5.2. Anemia de Fanconi	40
5.3. Deficiencia en Piruvato Kinasa Eritrocitaria	42
6. INMUNIDAD PRENATAL	43
III. OBJETIVOS	47
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	48
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	48
2. VECTORES DE TRANSFERENCIA GÉNICA	49
2.1. Vectores gamma-retrovirales	49
2.1.1. Generación de líneas productoras y sobrenadantes retrovirales utilizando la línea celular empaquetadora Phoenix-Eco	49
2.1.2. Titulación de sobrenadantes gamma-retrovirales	51
2.2. Vectores lentivirales	51
2.2.1. Generación de sobrenadantes lentivirales	51
2.2.2. Titulación de sobrenadantes lentivirales	54

3. PURIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES HEMATOPOYÉTICAS.....	55
3.1. Purificación de subpoblaciones hematopoyéticas de médula ósea.....	55
3.2. Purificación de subpoblaciones hematopoyéticas de hígado fetal.....	56
4. INFECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CON VECTORES VIRALES.....	57
4.1. Transducción de progenitores hematopoyéticos con vectores gamma-retrovirales.....	57
4.2. Transducción de progenitores hematopoyéticos con vectores lentivirales....	58
5. ENSAYOS CLONOGÉNICOS.....	59
6. TRASPLANTE <i>IN UTERO</i>	60
7. TRASPLANTE SINGÉNICO EN RATONES ADULTOS IRRADIADOS LETALMENTE.....	61
8. GENOTIPADO DE RATONES BRCA2.....	61
9. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	62
9.1. Descalcificación de ratones recién nacidos.....	62
9.2. Estudio histológico de neonatos para la evaluación de EICH.....	63
10. ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS.....	63
11. ANÁLISIS DE QUIMERISMO.....	64
11.1. Citometría de flujo.....	64
11.2. Q-PCR.....	65
12. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL TRANSGEN POR Q-PCR.....	65
13. CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE VARIACIÓN DE POBLACIONES ERITROIDES.....	66
14. ESTUDIOS DE RESPUESTA INMUNE.....	67
14.1. Reinmunización de ratones trasplantados <i>in utero</i>	67
14.2. Respuesta humoral frente a EGFP.....	67
14.3. Respuesta celular frente a EGFP.....	68
14.3.1. Ensayo de proliferación.....	68
14.3.2. Detección de INF -gamma.....	69
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	69
V. RESULTADOS.....	70
1. APR OXIMACIONES DE TERAPIA CELULAR MEDIANTE TRASPLANTE <i>IN</i> <i>UTERO</i> DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS ALOGÉNICAS.....	70

2. OPTIMIZACIÓN DEL MARCADO GENÉTICO DE LA HEMATOPOYESIS MEDIANTE TRASPLANTE <i>IN UTERO</i> DE CÉLULAS DE HÍGADO FETAL TRANSDUCIDAS CON VECTORES LENTIVIRALES.....	73
2.1. Trasplante <i>in utero</i> de células hematopoyéticas de hígado fetal utilizando protocolos estándar de transducción <i>in vitro</i>	75
2.2. Optimización de las condiciones de transducción de las células hematopoyéticas de hígado fetal con vectores lentivirales.....	76
2.3. Estudios preliminares de trasplante <i>in utero</i> de progenitores hematopoyéticos de hígado fetal transducidos en condiciones de mínima manipulación.....	79
2.4. Trasplante de progenitores hematopoyéticos de hígado fetal transducidos en condiciones optimizadas.....	83
2.5. Estudios de respuesta inmune en ratones trasplantados <i>in utero</i> con células marcadas genéticamente.....	96
3. TERAPIA PRENATAL EN MODELOS MURINOS DE ENFERMEDADES MONOGENICAS.....	103
3.1. Terapia celular en un modelo de ratón de Anemia de Fanconi (AF-D1).....	103
3.2. Modelo de terapia génica <i>ex vivo</i> en ratones deficientes en Piruvato Kinasa Eritrocitaria.....	105
VI. DISCUSIÓN.....	112
1. EL TRASPLANTE <i>IN UTERO</i> DE POBLACIONES ENRIQUECIDAS EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS ALOGÉNICOS PUEDE INDUCIR ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUESPED.....	112
2. EL TRASPLANTE <i>IN UTERO</i> DE PROGENITORES DE HÍGADO FETAL SINGÉNICO CORREGIDOS GENÉTICAMENTE COMO ALTERNATIVA AL TRASPLANTE PRENATAL DE CÉLULAS ALOGÉNICAS.....	115
2.1. Las células Lin ⁻ de hígado fetal se transducen con elevada eficiencia utilizando vectores lentivirales durante periodos muy cortos de infección y bajas multiplicidades de infección.....	117
2.2. Las células Lin ⁻ de hígado fetal transducidas con vectores lentivirales durante tiempos cortos de infección mantienen su capacidad de injerto hematopoyético a largo plazo tras trasplante <i>in utero</i>	118
2.3. Los ratones trasplantados <i>in utero</i> con células transducidas son capaces de generar una respuesta inmune frente a EGFP.....	120

3. EL TRASPLANTE <i>IN UTERO</i> DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS COMO ALTERNATIVA AL TRASPLANTE POSTNATAL EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD.....	123
3.1. Los progenitores hematopoyéticos sanos trasplantados <i>in utero</i> en ratones AF -D1 pueden desarrollar ventaja proliferativa frente a la hematopoyesis endógena.....	123
3.2. Los progenitores hematopoyéticos de ratones DPK transducidos con vectores retrovirales que portan el gen corrector y trasplantados <i>in utero</i> restauran parcialmente el fenotipo anémico.....	125
4. CONSIDERACIONES ÚLTIMAS.....	126
VII. CONCLUSIONES.....	128
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	130
IX. ANEXO.....	154

SUMMARY

Allogeneic bone marrow transplantation in adult recipients is frequently used for the treatment of a wide range of hematopoietic disorders (Flake, 2004). This kind of transplant requires a compatible donor and a myeloablative or submyeloablative conditioning to facilitate the engraftment of the exogenous healthy cells. Major complications of this therapy are graft versus host disease (GVHD) and graft rejection, that compromise the success of the treatment and the survival of the patient (Surbek et al., 2008). In some inherited diseases, the allogeneic transplantation of hematopoietic cells after birth is not effective because the pathological manifestations of the disease have already occurred during fetal development (Waddington et al., 2005) (Coutelle et al., 1995). Improvements of molecular biology techniques and the possibility of collecting biopsies during the early stages of fetal development, such as chorionic villus samples obtained in the first trimester of gestation, facilitates an early prenatal diagnosis of the disease (Alfirevic y von Dadelszen, 2003). These technical improvements permit to treat the fetus during the theoretical window of opportunity (between the last weeks of the first trimester and the second trimester in humans), which confers advantage in the receptivity of the graft and specific tolerance induction to exogenous cells (Hayashi y Flake, 2001). Therefore, *in utero* hematopoietic cell transplantation (IUHCT) might avoid many of the problems of postnatal therapy, because the early gestational immune system undergoes a process of self-education that could facilitate the engraftment of allogeneic or genetically corrected autologous cells in the developing fetus without the need of myeloablation (Flake, 2004) (Muench, 2005).

Most IUHCT approaches have been conducted with allogeneic hematopoietic stem cells. Prenatal transplants in animal models, including mice, are numberless and there have been more than 50 protocols performed in humans, obtaining real success only in X1-SCID immunodeficiencies (Muench, 2005). Recently, evidences of the presence of an immune barrier in mice transplanted *in utero* with allogeneic hematopoietic cells has been reported (Peranteau et al., 2007). In that study, the percentages of quimerism in fetal mice transplanted with allogeneic cells were lower than in mice transplanted with syngeneic cells. Additionally, none of the mice transplanted with allogeneic cells maintained the quimerism beyond 30 days after birth.

With the aim of improving the success of IUHCT for the treatment of inherited disorders, we injected allogeneic hematopoietic grafts enriched in hematopoietic progenitors in 14.5 days old fetuses. When we transplanted purified Lin⁻Sca1⁺ cells we

observed a decrease in mice survival, as well as in the engraftment of the animals, which was coincident with previous reports using non-purified grafts. Moreover, 10% of born mice were smaller than their littermates, showed darker skin and died between seven to ten days after birth. These mice presented intradermic infiltrations of white blood cells and lymphocyte infiltrations in dermis and epidermis, indicating the generation of graft versus host disease (GVHD) in these animals. This phenotype was coincident with that described in adult recipients with acute GVHD (Heymer, 2002).

The principal sources for hematopoietic transplantation in humans are adult bone marrow, G-CSF mobilized peripheral blood and also umbilical cord blood. For IUHCT, fetal liver HSCs might constitute a good alternative to these HSCs sources, because in that case the recipient and the hematopoietic graft would have the same developmental age (Muench, 2005). Thus, the use of autologous genetically corrected fetal liver cells would be an option that should be investigated in IUHCT approaches. Recent studies have shown that fetal liver hematopoietic stem cells (HSCs) are proliferating more actively compared to adult bone marrow HSCs (Bowie et al., 2006) (Nygren et al., 2006) and have a different regulation by transcription factors (Kim et al., 2007). These differences may imply the necessity of optimizing the conditions for the *in vitro* manipulation and genetic correction of FL-HSCs. In addition, differences in surface markers (Kim et al., 2005) could confer fetal liver HSCs engraftment and homing advantages over adult HSCs after IUHCT.

Since lentiviral vectors can transduce non dividing cells (Naldini et al., 1996) (Sutton et al., 1998), a prestimulation period is unnecessary to transduce HSCs with these vectors. This observation together with the inherent features of fetal liver HSCs, would permit to shorten the transduction period of these samples with lentiviral vectors. With the aim of improving the efficiency of transduction of fetal liver HSCs, we tested different combinations of cytokines in plates pretreated or not with the fibronectin fragment CH-296 (retronectin) using short transduction periods (3 or 6 hours) and low multiplicities of infection (MOI 5 or 10). The highest percentages of transduction were reached with MOIs of 10 pfu/cell after 6 hours of infection in plates pretreated with retronectin. The total number of progenitors was increased when retronectin was included during the infection process, supporting previously reported studies about the enhanced *ex vivo* gene transfer and inhibition of apoptosis in CD34⁺ cells transduced in presence of retronectin (Donahue et al., 2001). Additionally, the combination of mSCF,

Flt3 and hTPO was the most efficient to increase the transduction efficiency and survival of fetal liver hematopoietic progenitors. This combination has been widely used for the transduction and culture of cord blood progenitors (Li et al., 2006) (Lam et al., 2001). Since it has been reported that mSCF y hTPO promote fetal liver HSCs survival and expansion (Matsunaga et al., 1998) (Sitnicka et al., 1996) (Yagi et al., 1999) as well as HSCs self-renewal in culture (Miller y Eaves, 1997) (Albella et al., 1999), we tested whether hIL11 could also favour fetal liver growth and transduction. Our results were consistent with those reported by Bowie et al (2007) showing that hIL11 has an inhibitory effect in self-renewal of fetal liver HSCs.

Previous data obtained in our laboratory showed a long-term and multilineage engraftment of retrovirally transduced bone marrow transplanted *in utero* in syngeneic mice (Rio et al., 2005). Evidences of *in utero* engraftment of allogeneic cells have been reported in different animal models and also in humans (Flake, 2004) (Merianos et al., 2008a). However, recent studies have shown failures of long-term engraftment after IUHCT of allogeneic grafts in mice (Peranteau et al., 2007) suggesting an immunocompetent status of the fetus (Merianos et al., 2008b). The use of autologous corrected cells could avoid rejection problems associated to the transplantation of allogeneic cells. Moreover, animal models of ex-vivo gene therapy would prevent the direct injection of the vector in the recipient avoiding the risks of gene transfer to the germ-line and would reduce the risks of immunoreaction to the transgene (Bigger et al., 2006) (Waddington et al., 2005).

Immunoresponse to transgenes expressed in cells transplanted into adult animals has been previously described (Morris et al., 2004) (Stripecke et al., 1999). EGFP, EYFP (Morris et al., 2004), β -galactosidase (Izembart et al., 1999) and neomycin phosphotransferase (neo) (Heim et al., 2000) are known immunogens, but until now there are no reports about immunoreactivity to xenogeneic proteins expressed in cells transplanted *in utero*. In our experiments we have observed a decrease in the percentage of chimeric mice when we transplanted *in utero* fetal liver progenitors transduced with EGFP LVs. When we analyzed the immunoreactivity against EGFP, 61% of the animals showed anti-EGFP antibodies in serum and 33 % of analyzed mice showed a cellular response against the xenogeneic protein. A group of animals previously transplanted *in utero* were re-immunized by recombinant EGFP injection, 180 days after birth. Twenty percent of them showed secondary immunoreponse to

EGFP. None of them had EGFP⁺ cells engrafted. On the other hand, other animals engrafted with EGFP⁺ cells did not show antibodies or cellular response to EGFP at 5 months post-birth. All these data suggest for the first time that mice transplanted *in utero* with EGFP transduced hematopoietic progenitors can generate a complete and specific immunoresponse to EGFP. This reaction generates engraftment failure of the hematopoietic cells expressing EGFP. Significantly, some mice were able to develop tolerance to the exogenous protein after the injection, and maintained a long term engraftment. Tolerance to exogenous transgene products has been previously described in transplanted adult animals (Puig et al., 2002) (Morris et al., 2004) (Stripecke et al., 1999), but as far as we know these are the first observations of tolerance to transgene products after IUT.

Fanconi Anemia (FA) and Piruvate Kinase Deficiency (PKD) are two diseases in which prenatal therapy may constitute a therapeutic alternative to postnatal transplant (Muench, 2005) (Steiner y Gallagher, 2007) (Afriat et al., 1995) (D'Andrea y Grompe, 1997). With the aim of testing the efficiency of IUHCT in these two pathologies, we performed two different transplantation protocols of cell and gene therapy in FA-D1 mice and PKD mice, respectively.

FA-D1 mice have a hypomorphic mutation in exon 27 of the *Brca2/FancD1* gene, and exhibit a proliferative defect in the HSCs, as well as chromosomal instability, hypersensitivity to DNA crosslinkers and cancer predisposition (Navarro et al., 2006) (Cohn y D'Andrea, 2008). Bone marrow progenitors from syngeneic healthy mice were transplanted *in utero* in wild type as well as in heterocygous and homozygous *Brca2/FancD1* mice. All animals analyzed except one showed microquimerism. This mouse was homozygous for the mutation and showed a 99% of engraftment 60 days post-birth. This result suggests that syngeneic wild type hematopoietic progenitors present a proliferative advantage when transplanted in FA-D1 fetuses, facilitating the complete replacement of their endogenous defective hematopoiesis. The same observation was reported in adult non-irradiated FA-D1 animals transplanted with high numbers of wild type bone marrow cells (Navarro et al., 2006). Rio et al. also reported complete reconstitution of mild conditioned FA-D1 mice after injecting 5×10^5 Lin⁻ cells from FA-D1 mice after genetic correction (Rio et al., 2008).

PKD is an autosomal recessive disorder with a wide range of pathological manifestations. Currently, there is no definitive treatment for the most severe PKD cases (Zauchar et al., 2001) (Richard et al., 2004) (Cazzola, 2005). While splenectomy can be clinically useful for some PKD patients, in some cases, allogeneic hematopoietic transplantation is required (Tanphaichitr et al., 2000) (Suvatte et al., 1998). In these patients, transplantation of autologous hematopoietic progenitors transduced with therapeutic vectors could be a good therapeutic alternative.

Since PKD can be diagnosed during fetal development (Steiner and Gallagher, 2007) (Afriat et al., 1995), these patients could be prenatally treated by means of *ex vivo* gene therapy. Thus, we tested this therapeutic strategy by using a mouse model of PKD. Hematopoietic progenitors were retrovirally transduced with vectors expressing the human erythroid purine kinase (RPK) and the EGFP reporter gene (Meza et al., 2007), and transplanted into 14.5 days old PKD mouse fetuses. Engraftment and phenotype correction were evaluated until day 90 post-birth. Corrected EGFP⁺ cells were detected by flow cytometry and Q-PCR. Forty percent of the animals showed corrected cells in peripheral blood, bone marrow and spleen. The percentage of quimerism analyzed by flow cytometry was 0.3% on average, and we could detect EGFP⁺ erythrocytes in peripheral blood. By Q-PCR the percentage of transduced engrafted cells in bone marrow was 0.8%. This low number of engrafted cells only allowed a partial correction in the phenotype of the animals (higher levels of erythrocytes, haemoglobin and hematocrit) but not complete reversion of the anemic phenotype. Erythroid differentiation dynamics in peripheral blood and bone marrow were normalized after IUT, despite the low percentage of quimerism. In summary, low percentages of EGFP⁺ engrafted cells in PKD mice transplanted *in utero* were enough to achieve a partial phenotypic correction, similar to what has been reported in irradiated adult animals engrafted with 8-10% of corrected cells (Meza et al., submitted). This observation suggests that, in PKD, the IUT of genetically corrected cells is more efficient compared to transplantations conducted in adults.

Overall, prenatal gene therapy could be a therapeutic alternative for the treatment of a number of diseases with early pathological manifestations. We have studied different approaches of gene and cell therapy by means of *in utero* transplantation of hematopoietic progenitors. Transplantation of autologous corrected cells could be a useful solution to avoid problems associated with allogeneic transplantation, but our

studies show that cells expressing exogenous transgenes can generate immunoresponses in recipient mice after *in utero* transplantation. Most probably, the transplantation of limited numbers of transduced cells and the use of weak promoters could overcome this problem.

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

1.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

Se denomina hematopoyesis al proceso de producción y mantenimiento de todos los tipos celulares presentes en la sangre, llevado a cabo por las células hematopoyéticas. El sistema hematopoyético es un tejido altamente jerarquizado en el que un número reducido de células, denominadas células madre, son capaces de dar lugar a todos los linajes hematopoyéticos presentes en la sangre (Figura 1).

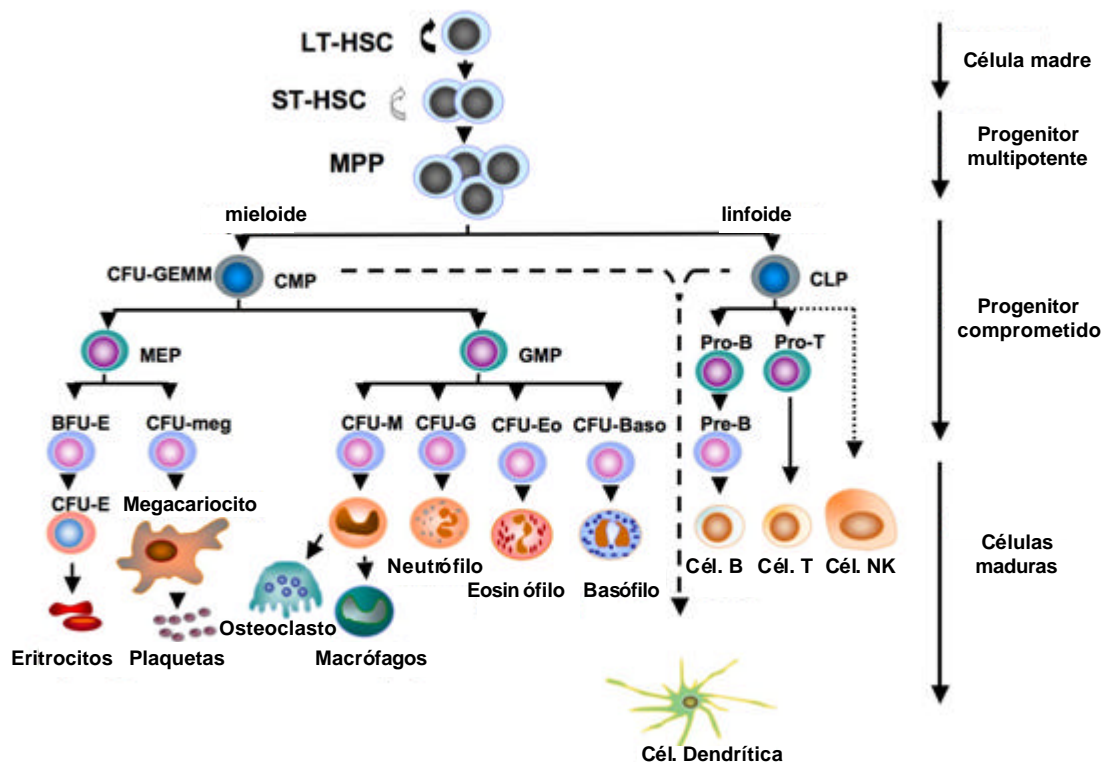


Figura 1. Esquema de la organización jerárquica del sistema hematopoyético.

La homeostasis del sistema hematopoyético la realizan las células hematopoyéticas junto con factores de regulación y células estromales (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, mesenquimales y adipocitos) y accesorias (linfocitos

T y monocitos) presentes en los diferentes nichos hematopoyéticos. Todos ellos son capaces de influir en el automantenimiento, proliferación y diferenciación de las células madre y precursores hematopoyéticos comprometidos (Mayani et al., 1992).

El tejido hematopoyético se compone de dos líneas principales de diferenciación: la línea mieloide (células eritroides, monocitos, granulocitos y megacariocitos) y la línea linfoide (linfocitos T, linfocitos B y células NK). Además, hay que incluir todas aquellas células que, originadas en los órganos hematopoyéticos, se asientan en diversos tejidos, como pueden ser macrófagos tisulares y células dendríticas del tejido linfoide.

El tejido hematopoyético se ha clasificado en distintos compartimentos celulares:

- *Células de morfología reconocible*. Incluye células en maduración y células maduras funcionales. La mayor parte de estas células presenta baja o nula capacidad de proliferación y de automantenimiento.

- *Compartimento de progenitores comprometidos*. Son células morfológicamente irreconocibles dirigidas a diferenciarse a un tipo celular concreto (Metcalf, 1989), poseen una elevada capacidad proliferativa pero una baja capacidad de automantenimiento. Su frecuencia es aproximadamente de 1:1000 células de médula ósea.

Mediante técnicas de cultivo *in vitro* se pueden detectar, cuantificar y caracterizar a los precursores hematopoyéticos comprometidos según su capacidad para generar colonias de células maduras hematopoyéticas al ser estimulados por determinados factores de crecimiento hematopoyético (Martin et al., 1970) (Morrison et al., 1995). Esta es la base de los ensayos clonogénicos. De esta manera, la formación de colonias hematopoyéticas es una prueba indirecta de la presencia de determinados precursores hematopoyéticos, principalmente:

- Precursores eritroides primitivos (BFU-E) y comprometidos (CFU-E). (Gregory y Eaves, 1978).
- Precursores gránulo-macrofágicos (CFU-GM). (Bradley y Metcalf, 1966; Pluznik y Sachs, 1965).
- Precursores megacariocíticos (CFU-Meg). (McLeod et al., 1976; Metcalf et al., 1975; Nakeff y Daniels-McQueen, 1976).

- *Compartimento de células madre*. Son células morfológicamente irreconocibles, multipotentes, con elevada capacidad de automantenimiento y baja tasa de proliferación.

La frecuencia de células madre hematopoyéticas (CMH) en la médula ósea adulta es baja: entre $1/10^4$ y $1/10^5$. En condiciones estacionarias, un pequeño porcentaje de estas células (<10%) se encuentra en fase de síntesis de ADN; el resto se encuentra en estado quiescente (G_0). Existen ensayos *in vitro* que tratan de identificar esta población celular, como son los cultivos de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC, *Long term culture-initiating cell*) (Lemieux et al., 1995), y las células formadoras de áreas de empedrado (CAFC, *Cobblestone area forming cell*) (Ploemacher et al., 1989). En un principio se asumió que la célula madre era la unidad formadora de colonias esplénicas en ratones irradiados y trasplantados con células hematopoyéticas (CFU-S). Actualmente, el ensayo que mejor define a una célula madre hematopoyética es el ensayo de repoblación competitiva (ERC) (Harrison, 1980). Este ensayo tiene como fundamento la reconstitución hematopoyética a largo plazo de receptores trasplantados, previamente tratados con dosis altas de radiación. Los ratones son trasplantados con una población celular procedente de un donante singénico y otra población competidora diferenciable (ratón congénico). Si alguna de las poblaciones competidoras tiene un potencial de repoblación superior a la otra, en los receptores trasplantados predominarán las células procedentes de esa población (Harrison, 1980) (Harrison et al., 1993) (Szilvassy et al., 1990). Existen varios sistemas para diferenciar las dos poblaciones competidoras, pero el más utilizado se basa en el análisis del marcador panleucocitario Ly5 en sus variantes alélicos Ly5.1 y Ly5.2, que son fácilmente detectables por citometría de flujo mediante anticuerpos monoclonales específicos (Laterveer et al., 1995) (Varas et al., 1998) (Szilvassy et al., 1990).

No se conoce ningún marcador restringido exclusivamente a las células madre hematopoyéticas, pero se ha descrito la expresión de algunas proteínas de membrana que pueden ser utilizadas como marcadores asociados a progenitores y a CMH. Recientemente se están haciendo grandes esfuerzos por conocer los distintos marcadores que definen las CMH en los diferentes estadios del desarrollo (Tabla I). Aunque la expresión de las proteínas de membrana que definen las CMH no es universal durante la ontogenia del sistema hematopoyético (Ratajczak, 2008), se ha demostrado ampliamente que, en un ratón adulto, los progenitores hematopoyéticos tienen capacidad de repoblación a largo plazo, se encuentran en la población de

células que no expresan marcadores de linajes hematopoyéticos eritroides, monocíticos, granulocíticos y linfocíticos (Lin^-), y que sí expresan los marcadores Ly6A (*Stem-cell antigen 1*, Sca1^+), y cKit^+ (LSK). Esta población LSK comprende el 0,5% de la médula ósea (Morrison et al., 1995). Tan sólo 100 células LSK son suficientes para repoblar a largo plazo un ratón en todos sus linajes linfohematopoyéticos (Jordan y Lemischka, 1990). Las células hematopoyéticas débilmente marcadas con Rhodamina 123 (Rho^{low}) (Visser et al., 1984) y las que presentan baja capacidad para retener el marcador de ADN Hoechst 33342 (*side-population*, SP) (Bunting, 2002) (Goodell et al., 2005), corresponden a poblaciones con elevada capacidad de repoblación hematopoyética a largo plazo. Con estos y otros marcadores de superficie adicionales, se pueden distinguir tres subpoblaciones de células LSK:

- Células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a largo plazo (*long-term hematopoietic stem cells*, LT-HSCs): Lin^- , Sca1^+ , cKit^+ , $\text{Thy1.1}^{\text{low}}$, FLT3^- , SP^+ , CD38^+ , CD150^+ , Rho^{low} , N-cad^+ , TIE2^+ , Endoglin^+ y MYC^{low} (Kiel et al., 2005) (Wilson y Trumpp, 2006).
- Células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a corto plazo (*short-term hematopoietic stem cells*, ST-HSCs): Lin^- , Sca1^+ , cKit^+ , $\text{Thy1.1}^{\text{low}}$, FLT3^- , CD34^+ y $\text{CD11b}^{\text{low}}$ (Wilson y Trumpp, 2006) (Yang et al., 2005).
- Células progenitoras hematopoyéticas comprometidas, precursores primitivos de linaje linfoid-mieloide pero sin capacidad de diferenciación a linajes eritroide y megacariocítico. (*lymphoid-primed multipotent progenitors*; LMPPs): Lin^- , Sca1^+ , cKit^+ , CD34^+ y FLT3^+ (Adolfsson et al., 2005).

Tabla I. Fenotipo de CMHs murinas y humanas en diferentes estadios del desarrollo. Los marcadores indicados en cada caso se usan combinados para aislar poblaciones muy enriquecidas en CMHs. * algunas poblaciones de CMH muy primitivas se han descrito como CD34⁻CD38⁻Lin⁻.

CMH	Ratón	Humano
Hemangiblasto (oleada primitiva, saco vitelino)	Flk-1 (Kdr) ⁺	ND
Pre-CMH (AGM)	CD34 ⁺ CD41 ⁺ Sca-1 ⁻ CD45 ⁻	ND
CMH (AGM, placenta)	CD34 ⁺ CD45 ⁺ CD41 ^{+/+} Sca-1 ^{+/+}	CD34 ⁺
CMH (hígado fetal)	Sca-1 ⁺ CD34 ⁺ CD45 ⁺ Mac1 ⁺ CXCR4 ⁺	CD34 ⁺ CD133 ⁺ CXCR4 ⁺ Lin ⁻
CMH (médula ósea)	c-kit ⁺ Thy1.1(CD90) ^b Lin ⁻ Sca ^{hi} (KTLS)	CD34 ⁺ CD38 ⁻ Lin ^b
	Sca-1 ⁺ CD34 ^{+/+} CD45 ⁺ Lin ⁻	CD34 ⁺ CD133 ⁺ CXCR4 ⁺ Lin ⁻
	CD150 ⁺ CD48 ⁻ CD244 ⁻ (SLAM)	Rh123 ^{low} , Hoe3342 ^{low} , PyroninY ^{low}
	Rh123 ^{low} , Hoe3342 ^{low} , PyroninY ^{low}	ALDH ^{high} (e.g., ALDH ^{hi} CD133 ⁺ Lin ⁻)
	5-FU resistant	CD150 ⁺ CD48 ⁻ CD244 ⁻ (SLAM)
	Aldehyde dehydrogenase ^{high}	Side-population cells
	Fr25 (small cells) Lin ⁻	
	Side-population cells	

Para el estudio de las células madre hematopoyéticas humanas se han utilizado ratones NOD/LtSz-scid/scid (Civin et al., 1996) (Kamel-Reid y Dick, 1988) (Larochelle et al., 1996) (McCune et al., 1988). Estos ratones fueron generados a partir del retrocruzamiento durante 10 generaciones de la mutación scid con la cepa NOD/Lt, produciéndose ratones inmunodeficientes, que carecen de células linfoides funcionales y de inmunoglobulinas (Shultz et al., 1995). Utilizando este modelo se ha demostrado que la población de células hematopoyéticas humanas CD34⁺ tiene capacidad de reconstitución a largo plazo (Krause et al., 1996) (Yabe et al., 1996) (Civin et al., 1996) (Kamel-Reid y Dick, 1988) (Larochelle et al., 1996) (McCune et al., 1988). Las células con capacidad de iniciar injerto multilínea en ratones NOD/SCID se denominan células repobladoras de ratones SCID (*SCID repopulating cells*, SRCs). Posteriormente se descubrió una fracción de células hematopoyéticas humanas, con fenotipo Lin⁻CD34⁻CD38⁻, con actividad SRC (Bhatia et al., 1998), que resultaba ser precursora de la fracción de células CD34⁺. La caracterización más detallada de la fracción de células con capacidad SRC desveló la existencia de dos poblaciones: células con capacidad de repoblación a corto plazo (*short term SRCs*, ST-SRCs), y células con capacidad de repoblación a largo plazo. (*long term SRCs*, LT-SRCs) (Guenechea et al., 2001).

En los últimos años, diferentes publicaciones han demostrado la capacidad de las células madre presentes en tejidos adultos, entre ellas las células madre hematopoyéticas, para dar lugar a tipos celulares de otros tejidos. Este proceso es conocido como plasticidad celular (Graf, 2002) (Herzog et al., 2003) (Krause, 2002)

(Theise et al., 2003) . La incidencia de este fenómeno parece ser muy variable y ha sido demostrada en diferentes modelos animales. De este modo, se han observado fenómenos de generación de células de músculo esquelético (Gussoni et al., 1999) (Jackson et al., 1999) , músculo cardíaco (Jackson et al., 2001) , hepatocitos (Lagasse et al., 2000) (Petersen et al., 1999) (Theise et al., 2000) y tejido epitelial (Krause et al., 2001) a partir de células hematopoyéticas.

Sin embargo, también son recientes los artículos que apuntan a que esa capacidad de transdiferenciación es el resultado de la fusión de células hematopoyéticas con células diferenciadas de los tejidos diana (Quintana-Bustamante et al., 2006) (Terada et al., 2002) (Vassilopoulos et al., 2003) (Wagers et al., 2002) (Wang et al., 2003) (Ying et al., 2002).

1.2. ONTOGENIA DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

El sistema hematopoyético es uno de los primeros tejidos complejos que se desarrollan en mamíferos . El proceso de generación de células hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario es particularmente complejo ya que se produce en varios emplazamientos que están separados tanto espacial como temporalmente (Moore y Metcalf, 1970), característica que hace especialmente complicado describir la ontogenia de la hematopoyesis (Dzierzak y Speck, 2008).

La hematopoyesis es un proceso muy conservado a lo largo de la evolución en vertebrados. Durante el desarrollo embrionario en mamíferos, la producción de células hematopoyéticas ocurre secuencialmente en el saco vitelino, un área que rodea la aorta dorsal denominada región aorta -gónada mesonefros (AGM) (Medvinsky y Dzierzak, 1996) (Sanchez et al., 1996) , en el hígado fetal y finalmente en la médula ósea (Dieterlen-Lievre et al., 1994) (Tavassoli, 1991) (figura 2). Recientemente la placenta ha sido reconocida como un sitio adicional que participa durante el mismo periodo que la región AGM y el hígado fetal (Orkin y Zon, 2008).

Las propiedades de las CMH difieren en cada uno de los sitios descritos anteriormente, probablemente reflejando los diversos nichos que dan soporte a su expansión y/o diferenciación y a las características extrínsecas de las células madre

en cada una de las etapas (Orkin y Zon, 2008). Por ejemplo, las CMH de hígado fetal se encuentran en un estadio proliferativamente activo mientras que las de médula ósea adulta están, en su mayor parte, quiescentes, en organismos sanos (Bowie et al., 2006).

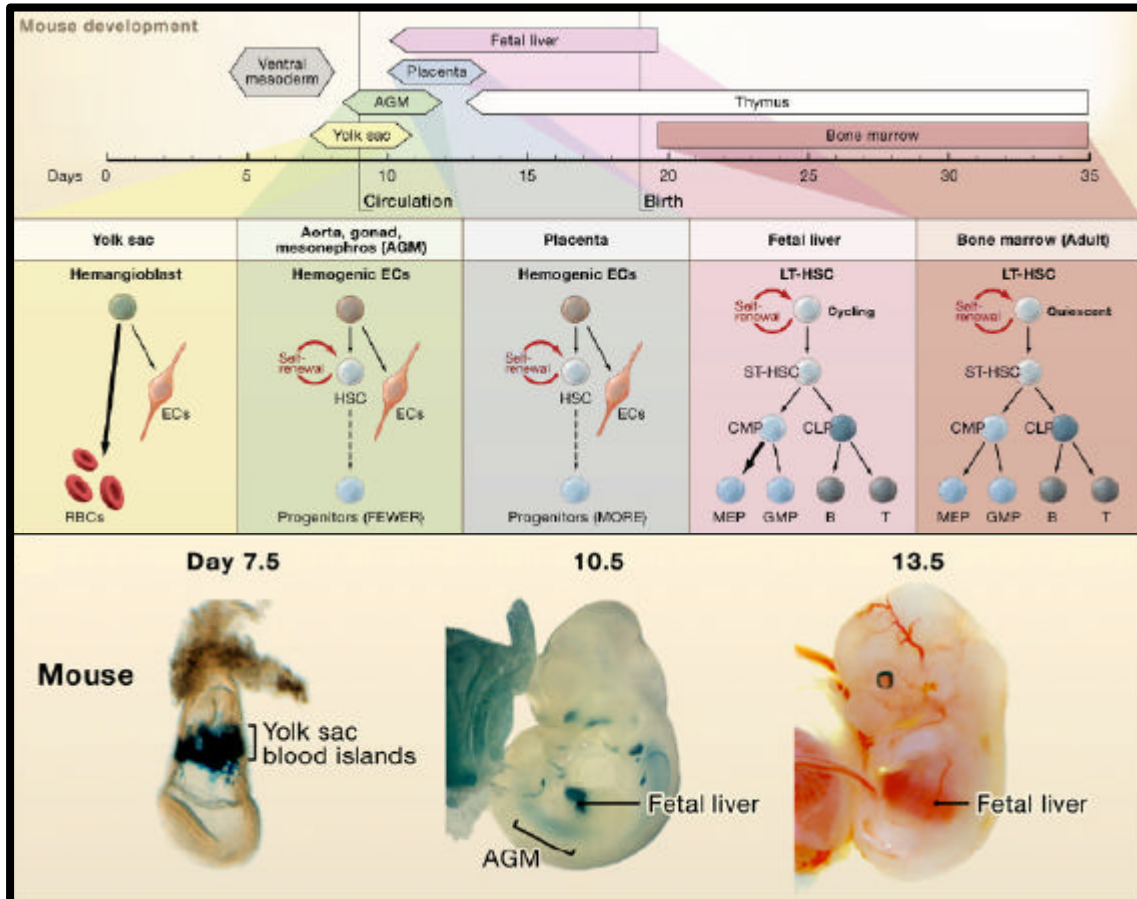


Figura 2. Desarrollo de la hematopoyesis en el ratón. La hematopoyesis comienza en los islotes sanguíneos del saco vitelino y durante el desarrollo del feto prosigue en la región AGM, la placenta y el hígado fetal, finalizando en la médula ósea, donde tiene lugar también en adultos. En cada localización se favorece la producción de linajes sanguíneos específicos que van cambiando a lo largo del desarrollo. En las imágenes superiores, las diferentes estructuras hematopoyéticas se visualizan mediante marcaje con LacZ en ratones transgénicos.

Abreviaturas: ECs, células endoteliales; RBCs, eritrocitos; LT-HSC, células madre hematopoyéticas con capacidad de repoblación a largo plazo; ST-HSC, células madre hematopoyéticas con capacidad de repoblación a corto plazo; CMP, progenitor mieloide común; CLP, progenitor linfóide común; MEP, progenitor megacariocítico/eritroide; GMP, progenitor granulomacrofágico. [Modificado de (Orkin y Zon, 2008)]

El origen de las células madre hematopoyéticas se encuentra en el mesodermo ventral (Murry y Keller, 2008) . La primera oleada de producción de las mismas en mamíferos se da en el saco vitelino, se denomina “hematopoyesis primitiva” y su principal función es producir eritrocitos para facilitar la oxigenación de los diferentes tejidos embrionarios en formación. Estos eritrocitos proceden, junto con las células vasculares, de un precursor de origen mesodérmico denominado hemangioblasto (Choi et al., 1998) (Fehling et al., 2003) (Huber et al., 2004) . Los hemangioblastos migran al saco vitelino donde se convierten en progenitores hematopoyéticos o endoteliales comprometidos y generan los islotes sanguíneos (Ferkowicz y Yoder, 2005) (Ueno y Weissman, 2006) . En estos islotes es donde se generan las células rojas cuya característica principal es la expresión de globinas embrionarias.

El sistema hematopoyético primitivo es reemplazado rápidamente por la hematopoyesis de tipo adulto o “definitiva”, que en mamíferos comienza en la región AGM. Una hoja del mesodermo lateral migra hacia el centro del embrión, toca el endodermo y forma un único tubo aórtico. Los clusters de células hematopoyéticas aparecen posteriormente en la pared ventral de la aorta (Muller et al., 1994).

En el embrión de ratón también existe actividad hematopoyética en las arterias umbilicales y en el alantoides (Inman y Downs, 2007) . Además se han encontrado células madre hematopoyéticas en la placenta del ratón (Gekas et al., 2005) (Ottersbach y Dzierzak, 2005) , coincidiendo con la aparición de las mismas en AGM y días más tarde . En la placenta, las CMH pueden generarse de novo o colonizar la placenta a través de la circulación. Aun no se conoce bien la contribución relativa de las anteriores estructuras al pool final de células madre hematopoyéticas.

El siguiente paso implica la colonización del hígado fetal, el timo, el bazo y finalmente la médula ósea (Orkin y Zon, 2008) (Dieterlen-Lievre et al., 1994) (Tavassoli, 1991). Se cree que en ninguno de estos sitios tiene lugar generación de células madre de novo, pero sí expansión de las poblaciones de células madre que migran a los otros órganos hematopoyéticos. Sin embargo, hasta el momento no se han podido visualizar directamente las células madre migrando de un nicho hematopoyético a otro y colonizándolos. Mientras que en individuos adultos de la especie humana la hematopoyesis se localiza fundamentalmente en la médula ósea, en ratón el bazo

tiene también capacidad hematopoyética (Morrison et al., 1995) (Till y McCulloch, 1961).

A pesar de la dificultad que conlleva el estudio de la hematopoyesis durante el desarrollo del individuo, definir el origen embrionario de los linajes celulares específicos es importante para entender como se desarrollan los tejidos en un organismo adulto.

2. TERAPIA GÉNICA DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

La terapia génica consiste en la modificación genética de las células de un individuo mediante la introducción de vectores que expresan transgenes de interés con el objeto de tratar enfermedades hereditarias y adquiridas.

Algunas enfermedades hematológicas son candidatas para ser tratadas mediante terapia génica. Clásicamente, las enfermedades monogénicas tales como las inmunodeficiencias severas combinadas (X1-SCID y ADA-SCID), las hemoglobinopatías, las enfermedades de almacenamiento enzimático y las patologías que afectan a las células madre hematopoyéticas, como la Anemia de Fanconi, han sido tratadas con genes terapéuticos que suplen al gen defectuoso o mutado. En tales casos lo ideal sería una terapia génica de sustitución, en la cual la secuencia terapéutica reemplaza la mutación del gen defectuoso. La terapia de sustitución aún está en desarrollo, por lo que el único método de terapia génica utilizado en la clínica se basa en la terapia génica de adición, en la cual se introduce en la célula el vector con el gen de interés, sin eliminar el gen defectuoso.

En los últimos años ha habido un interés creciente en conferir a las CMH propiedades nuevas, una estrategia que ha sido aplicada principalmente para el tratamiento del cáncer (Vollweiler et al., 2003). Las diferentes aproximaciones que se han aplicado incluyen la utilización de genes que inhiben la expresión de los genes tumorales, o bien genes suicidas que destruyen las células cancerosas en presencia de una droga. Las CMH manipuladas genéticamente también se están utilizando para

dar lugar a linfocitos con resistencia a la infección principalmente en protocolos para el tratamiento del VIH.

Los protocolos de terapia génica se pueden llevar a cabo mediante dos estrategias fundamentales: *in vivo* y *ex vivo*. La terapia génica *in vivo* se realiza mediante la infusión directa de los vectores que portan los genes de interés en los tejidos del paciente. La terapia génica *ex vivo* consiste en el tratamiento *in vitro* de células previamente extraídas del paciente con vectores que portan el transgén terapéutico y su posterior reinfusión en el paciente. La mayor parte de los protocolos de terapia génica se llevan a cabo utilizando una estrategia de terapia génica *ex vivo*. De esta manera, la introducción del gen de interés en la célula diana es más eficiente y se evita la presencia del transgén en tejidos no deseados.

El injerto y la proliferación clonal de un número relativamente pequeño de células hematopoyéticas normales puede mantener la hematopoyesis de un individuo durante toda su vida. Esta observación fundamenta el trasplante de médula ósea en pacientes con enfermedades hematológicas en ocasiones letales. Las células para este tipo de trasplante proceden, en la mayoría de los casos, de donantes HLA -compatibles, pero tras su infusión en el paciente estas células pueden ser rechazadas por el sistema inmune del mismo o bien puede generarse una enfermedad del injerto contra el huésped. Para evitar los problemas asociados a los trasplantes alogénicos de médula ósea, se puede aplicar la terapia génica a las enfermedades del sistema hematopoyético. Las principales dianas para la terapia génica *ex vivo* son las células madre y los progenitores hematopoyéticos del individuo enfermo que una vez corregidas con el vector terapéutico adecuado se reinfunden en el paciente.

2.1. VECTORES UTILIZADOS EN TERAPIA GÉNICA

Los vectores más usados para transferencia génica pueden subdividirse en virales y no virales. Los vectores virales (tabla II) pueden ser a su vez integrativos o no integrativos, dependiendo de si son capaces de introducirse en el genoma de la célula diana y así transmitirse a su descendencia. Los vectores no virales (p.e. liposomas, ADN desnudo) no son integrativos y se utilizan principalmente cuando no se requiere

una expresión a largo plazo del transgén. En cualquier caso, es necesario elegir el vector adecuado para cada enfermedad a tratar.

Tabla II. Vectores virales más utilizados en terapia génica.

VECTOR	EXPRESIÓN	ESTADO CELULAR	PSEUDOTIPADO*	CAPACIDAD	TÍTULO cfu/mL**	TIPO DE INSERCIÓN
GAMMARETROVIRUS	Estable	Mitosis	SI	Hasta 8 kb (transgén)	10^6 - 10^7	En unidades de transcripción (> cerca de promotores)
LENTIVIRUS	Estable	Mitosis/ Quiescentes	SI	Hasta 8 kb (transgén)	10^6 - 10^7	En unidades de transcripción (> Intrones)
ESPUMAVIRUS	Estable	Mitosis/ <Quiescentes	SI	Hasta 10 kb (transgén)	10^6 - 10^7	En islas CpG
ADENOVIRUS	Transitoria	Mitosis/ Quiescentes	NO	Hasta 32 kb (transgén)	10^{12}	----
VIRUS ADENOASOCIADOS	Estable	Mitosis/ Quiescentes	NO	Hasta 5 kb (transgén)	10^{14}	Puede dirigirse al cromosoma 19
VIRUS HERPES SIMPLEX	Transitoria	Mitosis/ Quiescentes	NO	30 o más kb (transgén)	10^4 - 10^8	----

* Los títulos pueden llegar a 10^{10} - 10^{12} cuando el vector es pseudotipado con la envuelta VSV -G.

** **cfu/mL**, unidades formadoras de colonias por ml de medio infectivo.

Los virus de la familia *Retroviridae* son virus que contienen su información genética en forma de ARN de cadena simple. Presentan una envuelta viral con una parte lipídica derivada de la membrana de la célula huésped y glicoproteínas virales codificadas en su propio material genético (Coffin et al., 1997). La característica principal de esta familia es su capacidad de convertir su material genético ARN en ADN de doble cadena gracias a la acción de la enzima **transcriptasa reversa**. El ADN viral tiene capacidad de integrarse en el genoma de la célula huésped y así aprovechar la maquinaria de replicación de la misma para dar lugar a nuevas moléculas de ADN viral.

La familia *Retroviridae* está compuesta por 7 géneros de los cuales los *Gammaretrovirus*, los *Lentivirus* y los *Espumavirus* son los más utilizados en terapia génica.

El genoma de los retrovirus consta de dos moléculas de ARN monocatenario y polaridad positiva formando un dímero mediante puentes de hidrógeno. Todos los retrovirus presentan al menos 3 genes cuyo orden es 5' -gag-pol-env-3'. El gen **gag** codifica las proteínas estructurales del virión: matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC). El gen **pol** codifica las enzimas virales: proteasa (PR), transcriptasa reversa (TR) e integrasa (IN). El gen **env** codifica la glicoproteína viral de

la envuelta, que está formada por las subunidades de superficie (SU) y transmembrana (TM).

Otras regiones importantes en el genoma de los retrovirus:

- **Región R:** secuencia corta (15 -250 nucleótidos) que forma una repetición directa en ambos extremos del genoma. En la mayoría de los retrovirus R contiene la señal de poliadenilación (AAUAAA).
- **U5:** región única no codificante de 70 -250 nucleótidos situada entre la región R y el sitio de unión del iniciador. Es la primera parte del genoma que se retrotranscribe formando el extremo 3' del genoma del provirus.
- **Sitio de unión del iniciador** (*Primer Binding Site*, PBS): región de 18 nucleótidos complementarios al extremo 3' del ARNt iniciador específico usado por el virus para iniciar la transcripción reversa.
- **Señal de empaquetamiento** Ψ : necesaria para que la maquinaria del virus empaquete las partículas del ARNm viral.
- **Región Leader:** región relativamente larga (90-500 nucleótidos) que no se traduce y que se encuentra a continuación del sitio de iniciación de la transcripción y por tanto está presente en el extremo 5'. En esta región se encuentran señales de unión a factores de transcripción importantes en la expresión del genoma viral.
- **Fragmento de polipurinas** (*Polypurine Tract*): región corta de unos 10 nucleótidos rica en purinas (A/G) que son responsables del inicio de la síntesis de la cadena (+) durante la transcripción reversa.
- **U3:** región única y no codificante de unos 200 -1.200 nucleótidos, que forma el extremo 5' del provirus después de que se lleve a cabo la transcripción reversa. Contiene los elementos promotores responsables de la transcripción llevada a cabo por el provirus. En esta región se encuentran el sitio *att*, señal indispensable para que la integrasa pueda llevar a cabo el proceso de integración.

Como consecuencia del proceso de transcripción reversa, en cada extremo del ADN proviral se generan repeticiones largas terminales (*Long Terminal Repeats*, LTRs), que son regiones de entre 300-1.800 nucleótidos formadas por los fragmentos 5'-U3-R-U5-3'. Estas secuencias incluyen las regiones activadoras y promotoras además de secuencias implicadas en la integración del virus.

El proceso de infección viral comienza con la entrada de un virión en una célula diana (Figura 3). En una primera fase, las partículas virales se unen a la célula mediante interacciones específicas entre la glicoproteína de la envuelta y los

receptores celulares específicos presentes en la membrana celular. Se fusionan ambas membranas y la cápside viral penetra en el citoplasma celular donde se libera y retrotranscribe el ARN vírico en ADN de cadena doble gracias a la transcriptasa reversa. El ADN unido al complejo nucleoproteico es transportado al núcleo donde se integra en el genoma celular por acción de la integrasa. Se denomina provirus al ADN viral integrado en el genoma de la célula huésped. En la fase de transcripción génica, se origina el ARN de los nuevos viriones y los ARNm que codifican las proteínas virales. El ARN se transporta al citoplasma donde tiene lugar el proceso de traducción del mensajero. Se ensamblan todos los componentes del virión y se produce la salida de las partículas virales de la célula por gemación. Durante este proceso el virus adquiere la doble capa lipídica que constituye su envuelta. El provirus también se replica junto con el material genético de la célula huésped pasando a las células hijas.

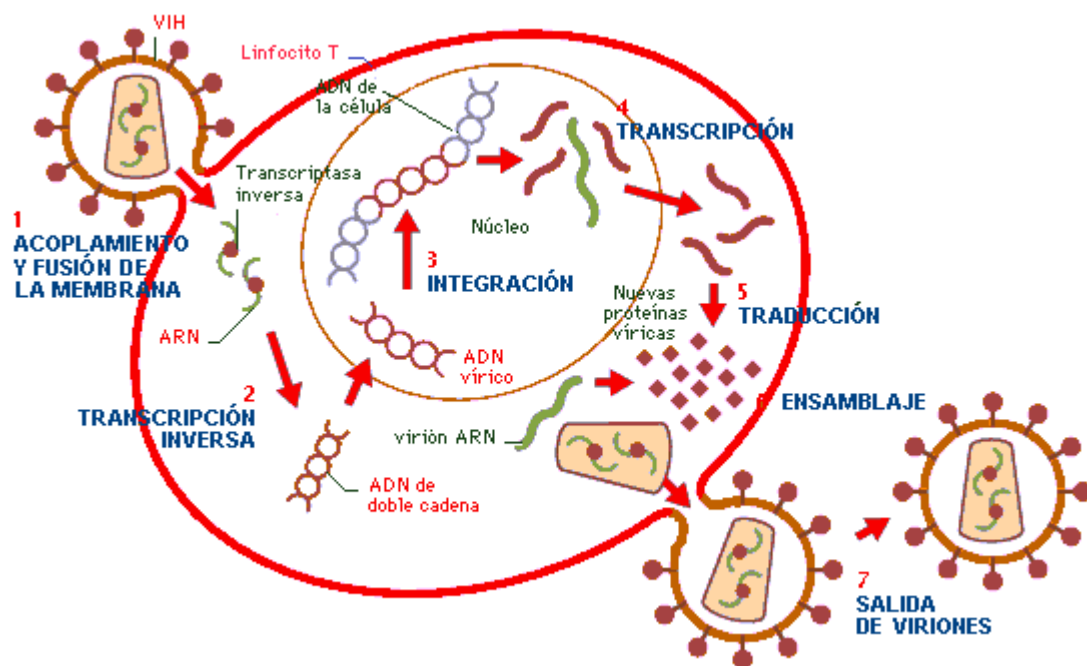


Figura 3. Ciclo de replicación de los retrovirus.

Los vectores retrovirales son retrovirus modificados de manera que son defectivos en replicación. Son capaces de transferir e integrar un gen exógeno en una célula diana, pero son incapaces de propagarse a otras células. Estos vectores se han generado eliminando los genes virales y sustituyéndolos por un gen marcador u otros genes de interés, y dejando solamente secuencias que actúan *in cis* y que son necesarias para una única ronda de replicación (Buchsacher y Wong-Staal, 2000).

Las construcciones que contienen estos elementos en *cis* pueden servir como vectores cuando *gag*, *pol* y *env* se proporcionan en *trans*. El tropismo de estos vectores se puede dirigir hacia diferentes tipos celulares usando diferentes glicoproteínas de la envuelta.

A continuación se describen brevemente los dos tipos de vectores retrovirales más utilizados en terapia génica, que son los que nos ocupan en esta memoria.

Vectores gammaretrovirales: son uno de los grupos de vectores más utilizados en terapia génica. Estos vectores no son capaces de transducir células quiescentes, por lo que es necesario preestimar previamente las CMH (Tisdale et al., 1998) para inducir la proliferación y que los vectores sean capaces de atravesar la membrana nuclear.

La generación de sobrenadantes a partir de vectores de este tipo puede hacerse mediante cotransfección transitoria del plásmido de interés con otros dos plásmidos que portan *gag/pol* y las proteínas de la envuelta, o utilizando líneas celulares empaquetadoras (p.e. Nxe), que llevan integrados los genes que codifican para las proteínas necesarias para el empaquetamiento y la generación de la envuelta.

Desde hace unos años, los resultados obtenidos mediante terapia génica han mejorado enormemente gracias a la optimización de la interacción entre el vector retroviral y la célula. Las principales modificaciones se han realizado en la proteína de la envuelta y en la utilización del fragmento CH296 de la fibronectina:

- Modificación de la proteína de la envuelta: la entrada del vector retroviral en la célula se produce gracias a la interacción entre la proteína de la envuelta del vector (producto del gen *env*) y un receptor presente en la célula diana. De esta forma, la presencia de una u otra glicoproteína de la envuelta determina el tropismo del virus hacia un tipo celular o especie concreta. Los vectores retrovirales pueden ser encapsidados con diferentes proteínas de la envuelta determinando así su tropismo hacia la especie o tipo celular deseado. Este proceso por el cual la envuelta de un vector se intercambia por la envuelta de otro virus, permitiendo la modificación de su tropismo original, recibe el nombre de pseudotipado del vector.

Entre los tipos de envuelta utilizados habitualmente destacan:

Proteína ecotrópica: Se une al receptor ecotrópico CAT-1 (transportador de aminoácidos cationicos) (Wang et al., 1994); (Albritton et al., 1993; Kavanaugh et al., 1994b; Kim et al., 1991) y es específico de células de ratón y rata. La glicoproteína

ecotrópica no permite la infección de células humanas.

Proteína anfotrópica: Es una glicoproteína con un amplio rango de huéspedes que incluye roedores, ratón, humanos, gallina, gato, perro y visón. El receptor anfotrópico, Ram1 codifica un transportador de fosfato dependiente de sodio (Kavanaugh et al., 1994a) (Miller et al., 1994) (Kozak et al., 1995).

Proteína de la envuelta de GALV (virus de la leucemia del mono gibbon): El receptor del GALV (Glv-1) es, al igual que el receptor anfotrópico, un transportador de fosfato dependiente de sodio (Kavanaugh et al., 1994a). Sin embargo, su presencia se ha descrito en humanos y en primates, pero no en ratón.

Proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G): Los virus pseudotipados con VSV-G entran en la célula interaccionando con fosfolípidos de la membrana celular, lo que les confiere la capacidad de infectar una amplia variedad de tipos celulares y especies, incluyendo insectos, peces, humanos, ratón y rana (Burns et al., 1993).

- Utilización del fragmento CH296 de la fibronectina: el fragmento CH296 es un péptido quimérico obtenido a partir de la fibronectina humana que está constituido por un dominio de unión a la célula y un dominio de unión a heparina. Comercialmente llamada retronectina, favorece la transducción mediante la colocación del virus y la célula, de forma que el virus se une al dominio de unión a heparina y la célula diana al dominio de unión celular, aumentando la proximidad entre ambos y, por lo tanto, la probabilidad de que el virus infecte la célula (Hanenberg et al., 1996). Desde su descubrimiento numerosos estudios han demostrado la capacidad de esta molécula para aumentar la transducción de CMHs humanas y de ratón con vectores retrovirales (Hanenberg et al., 1997) (Murray et al., 1999).

Vectores lentivirales: la mayor parte de ellos derivan del VIH y son capaces de infectar tanto células en división como quiescentes (Akkina et al., 1996) (Blomer et al., 1997) (Kafri et al., 1997) (Naldini et al., 1996) (Reiser et al., 1996) (Sutton et al., 1998) debido a que presentan un sistema de transporte activo del material genético a través del nucleoporo (Gallay et al., 1995) (von Schwedler et al., 1994) utilizando la maquinaria de transporte nuclear de la célula diana. Esto los hace más eficientes para transducir CMHs.

Los lentivirus son virus de genoma complejo (contienen 6 proteínas adicionales: Tat, Rev, Vpr, Vpu, Nef y Vif) con un ciclo de replicación algo más intrincado que los gammaretrovirus.

Para generar sobrenadantes lentivirales no ha sido posible generar líneas empaquetadoras debido a la alta toxicidad de la envuelta VSV-G (la más usada para empaquetar lentivirus) y de alguna de las proteínas auxiliares del lentivirus (Farson et al., 2001) (Kafri et al., 1999) (Klages et al., 2000) (Ory et al., 1996). Por este motivo los sobrenadantes lentivirales se generan por cotransfección transitoria de 3 ó 4 plásmidos (Naldini et al., 1996) (Zufferey et al., 1998). Los plásmidos que se utilizan son los siguientes:

-*Plásmidos empaquetadores*: el empaquetamiento se lleva a cabo con sólo tres de los nueve genes presentes en el genoma del virus parental (*gag*, *pol* y *rev*). Esto elimina la posibilidad de que se puedan reconstituir virus con capacidad de replicación por recombinación. En los vectores de tercera generación se han separado los genes *gag-pol* y el gen *rev* en dos plásmidos, lo que los hace más seguros.

-*Vectores de transferencia*: una característica de los LV y que tiene que ver con la seguridad que aportan, es que son autoinactivantes (*self-inactivating*, SIN). Esto se consigue delecionando una región de 400 pares de bases (pb) de las 455 que forman la región U3 de la LTR -3' en el ADN plasmídico que se usa para producir el vector ARN. Esta delección implica la eliminación de la caja TATA, para prevenir así tanto el inicio de la transcripción desde la LTR-5' del provirus integrado, como la capacidad del provirus de generar partículas replicativas competentes (Zufferey et al., 1998) (Miyoshi et al., 1998) (Miyoshi et al., 1998; Zufferey et al., 1998). Debido a esto, la expresión de los transgenes es dirigida por promotores internos que pueden ser LTR virales, con expresión fuerte, como la del virus formador de colonias esplénicas (SFFV) o la del citomegalovirus (CMV), o bien promotores de origen humano, con una expresión más débil, como el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el factor de elongación 1 α (EF1 α) o el fragmento hipersensible HS1 del promotor del oncogén VAV (Almarza et al., 2007).

En estas construcciones se han añadido regiones reguladoras en *cis* para mejorar la expresión de los transgenes. Es el caso de la región rica en polipurina (*polipurine tract*, cPPT), que facilita el transporte del provirus al núcleo para su integración. Esa región se presenta asociada a la secuencia de terminación central (CTS), que es la secuencia que determina la separación de la transcriptasa reversa. Varios autores han demostrado que la presencia de las secuencias cPPT/CTS en el vector lentiviral es beneficiosa, pero no esencial, para la producción de los sobrenadantes LV (Follenzi et al., 2000) (Zennou et al., 2000).

La mejora de expresión de los transgenes también se ha llevado a cabo

añadiendo elementos que actúan post-transcripcionalmente, como es el caso del elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis B de la marmota (Wpre) (Zufferey et al., 1999). Este elemento parece estar relacionado con la mejora del procesamiento y poliadenilación del extremo 3' (Loeb et al., 1999), por lo que actúa estabilizando el ARNm.

-Plásmido de la envuelta: la envuelta interacciona con un receptor específico de la célula diana. La proteína de la envuelta más usada hasta el momento para empaquetar LV ha sido la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (*Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G*, VSV-G) (Burns et al., 1993) (Reiser et al., 1996). Se ha descrito su capacidad de empaquetar vectores LV que transducen eficazmente neuronas (Blomer et al., 1997), miocitos (Kafri et al., 1997), hepatocitos (Park et al., 2000), células pancreáticas (Giannoukakis et al., 1999) y CMH de diferentes especies como perro (Horn et al., 2004), primates no humanos (Hanawa et al., 2004) (Horn et al., 2002), ratón (Hanawa et al., 2002) y humanos (Akkina et al., 1996) (Case et al., 1999) (Evans et al., 1999) (Douglas et al., 1999) (Follenzi et al., 2000) (Guenechea et al., 2000) (Miyoshi et al., 1999) (Sutton et al., 1999) (Uchida et al., 1998). Otros tipos de envueltas son las envueltas quiméricas modificadas en su región citoplasmática procedentes de la envuelta del virus de la leucemia del Gibbon (p.e. GALV-TR, GALV-TM) (Sandrin et al., 2002) (Relander et al., 2005) (Christodouloupoulos y Cannon, 2001) (Leurs et al., 2003) (Stitz et al., 2000) o del virus endógeno felino RD114 (RD114/TR) (Relander et al., 2005) (Sandrin et al., 2002).

2.2. PROTOCOLOS CLÍNICOS DE TERAPIA GÉNICA

En las últimas dos décadas se han llevado a cabo protocolos clínicos de terapia génica para numerosas enfermedades tanto monogénicas (ej. Anemia de Fanconi), como enfermedades tan complejas como el cáncer y las enfermedades vasculares. De entre todos ellos, los protocolos que han mostrado mayor beneficio clínico han sido los protocolos de terapia génica para Inmunodeficiencias Severas Combinadas (SCID) (Alexander et al., 2007).

La forma más común de SCID es una forma ligada al cromosoma X (SCID-X1) que recoge aproximadamente el 50% de los casos y está causada por mutaciones en la

cadena γc del receptor común de citoquinas. Se han llevado a cabo dos protocolos clínicos de terapia génica con resultado exitoso en un total de 20 niños con este tipo de inmunodeficiencia (Cavazzana-Calvo et al., 2000) (Hacein-Bey-Abina et al., 2002) (Gaspar et al., 2004). En ambos protocolos se utilizó un vector gamma -retroviral que portaba el ADNc de la cadena γc del receptor de gran afinidad de interleuquina 2 (IL - 2RG), para transducir células CD34⁺ *ex vivo*, que se reinfundieron en pacientes no acondicionados. El resultado fue un aumento del número de células T y un injerto a largo plazo de CMH transducidas no muy elevado, pero capaz de mantener la timopoyesis y por lo tanto la funcionalidad de las células B. Cuatro pacientes de uno de los protocolos desarrollaron leucemia linfoblástica aguda de células T asociada a fenómenos de mutagénesis insercional. En dos de ellos se observó que el vector se había integrado en el protooncogen LMO2, lo que generó un aumento de su expresión (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a; Hacein -Bey-Abina et al., 2003b). En el tercer caso el vector se encontró integrado en LMO2 y BMI1 y en el cuarto caso en el gen CCND2 (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Posteriormente se ha reportado un caso similar en uno de los pacientes del segundo protocolo, en el que se detectó un clon mayoritario con el sitio de integración del provirus próximo al gen LMO2 (ESGCT 2008).

La Granulomatosis Crónica (CGD) es un tipo de inmunodeficiencia hereditaria poco común que se caracteriza por la presencia de infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes debidas a un defecto funcional en la actividad antimicrobiana de los macrófagos (Heyworth et al., 2003). Aunque se habían llevado a cabo ensayos clínicos en Estados Unidos (Malech et al., 1997) (Barese et al., 2004)), los primeros resultados beneficiosos de la terapia génica se observaron en pacientes de un protocolo clínico llevado a cabo en Alemania. En el año 2004, se trasplantaron células CD34⁺ modificadas genéticamente con vectores gamma -retrovirales sobre dos pacientes adultos, a los que se les había sometido a un acondicionamiento no mieloablativo con busulfán. Este tratamiento supuso un beneficio clínico significativo en ambos pacientes al poco tiempo del trasplante. Sorprendentemente, también se pudo observar un incremento gradual de los granulocitos corregidos en sangre periférica, que se debía a la ventaja proliferativa que les confería la activación de los genes MDS1/EVI1, PRDM16 Y SETBP1 (Ott et al., 2006). Estos genes se activaron por efecto de la inserción del provirus y no generaron ningún efecto adverso en los pacientes. A los 2 años y medio, uno de los pacientes falleció por sepsis severa. Los análisis preliminares de las células transducidas revelaron la existencia de un fenómeno de

silenciamiento del transgén terapéutico (gp91phox). Estudios en el segundo paciente revelaron la existencia de un proceso similar (Alexander et al., 2007).

Otra forma menos frecuente de SCID está causada por la deficiencia en adenosina desaminasa (ADA) y está caracterizada por defectos inmunológicos y toxicidad orgánica y sistémica debidas a la acumulación de metabolitos de purinas. Los primeros protocolos clínicos no funcionaron como se esperaba debido a un nivel insuficiente de injerto de células transducidas. Estos pacientes eran dependientes de PEG-ADA para poder detoxificar completamente los metabolitos de las purinas, aunque después de 12 años no han mostrado efectos adversos (Aiuti et al., 2002a) (Muul et al., 2003). En el protocolo clínico que se inició en el 2000, se reinfundieron células CD34⁺ corregidas con retrovirus en pacientes levemente acondicionados con busulfan (Aiuti et al., 2002b). En la actualidad hay 12 pacientes trasplantados en los que se observan respuestas humoral y celular claramente mejoradas con un beneficio clínico probado sin la necesidad de una terapia de reemplazamiento enzimático. Además, hay un paciente trasplantado en Reino Unido siguiendo un protocolo similar pero con acondicionamiento con melfalán que presenta corrección inmunológica y bioquímica (Gaspar et al., 2006). Es importante destacar que ninguno de ellos ha mostrado eventos adversos relacionados con la terapia génica (Aiuti et al., 2007) (Aiuti et al., 2009).

3. DIAGNÓSTICO PRENATAL DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

En las dos últimas décadas, se han realizado grandes avances en el desarrollo de técnicas para el diagnóstico de enfermedades genéticas en estadíos muy tempranos del desarrollo fetal y diversos métodos para la obtención y análisis de células y DNA fetales.

El procedimiento más utilizado es la amniocentesis, que consiste en la obtención de una muestra de líquido amniótico a través de la punción y aspiración del contenido de la cavidad amniónica. Esta técnica constituye una herramienta fundamental en el diagnóstico prenatal y generalmente se realiza con fines de diagnóstico genético,

molecular, bioquímico, inmunológico o infeccioso. Se puede llevar a cabo desde las 9 semanas de gestación hasta el final del embarazo, aunque es preferible realizarla entre las 15 y 20 semanas de gestación. La amniocentesis precoz (antes de las 14 semanas de gestación) conlleva una mayor tasa de complicaciones, por lo que no es recomendable para su uso cotidiano. Para la realización de análisis genético temprano es preferible realizar biopsia de vellosidades coriónicas (CVS) (Surbek et al., 2001). Esta técnica consiste en la obtención de tejido placentario mediante punción y se lleva a cabo alrededor de las semanas 9 y 11 de gestación.

Otra forma de obtener células para el diagnóstico es a partir de la sangre fetal. El procedimiento más utilizado es la cordocentesis, pero en el caso de que esta técnica falle se puede obtener sangre fetal mediante punción de la vena intrahepática o cardiocentesis, que a pesar de ser técnicas más invasivas son muy útiles en los casos en los que existe sospecha de afectación y es necesario obtener un cariotipo rápido.

En los últimos años y gracias al desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han empezado a utilizar con éxito células fetales y DNA libre en plasma procedentes de la sangre materna para el diagnóstico prenatal de defectos cromosómicos o enfermedades monogénicas (Holzgreve, 1997). Estos métodos no invasivos de obtención de material fetal han demostrado su fiabilidad en el diagnóstico prenatal de diversas enfermedades como las hemoglobinopatías (Cheung et al., 1996) (Li et al., 2005). Además, con este tipo de técnicas, se pueden diagnosticar durante el primer trimestre del embarazo (semanas 10 -12) enfermedades genéticas del sistema linfohematopoyético y enfermedades de almacenamiento enzimático. En un futuro cercano, el mayor desarrollo de los métodos no invasivos y las técnicas de biología molecular, como los chips de DNA y la PCR, incrementarán el número de enfermedades diagnosticadas antes del nacimiento, incluyendo casos en los que no haya otro miembro afectado en la familia.

El desarrollo en los últimos años de técnicas de diagnóstico prenatal fiables, de bajo riesgo para el embarazo y que puedan realizarse lo más temprano posible en el desarrollo del feto, permite el abordaje de la enfermedad antes de que los síntomas tengan lugar y así evitar en lo posible fallo orgánico asociado a la misma (Alfirevic y von Dadelszen, 2003).

4. TERAPIA PRENATAL DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

El tratamiento prenatal de enfermedades hereditarias que se pueden diagnosticar durante el desarrollo fetal constituye una alternativa a la terapia postnatal, especialmente en aquellas enfermedades en las que se producen cambios patológicos irreversibles antes del nacimiento del individuo o a edades muy tempranas (Waddington et al., 2005) (Surbek et al., 2008).

Durante el desarrollo fetal del sistema hematopoyético y del sistema inmune existe una ventana de oportunidad teórica proporcionada por las propiedades ontogénicas del feto (Flake, 2004). Estas propiedades están caracterizadas por la transición de las células que sustentan la hematopoyesis desde el saco vitelino y la región AGM al hígado fetal, y posteriormente a la médula ósea fetal, y por la falta de madurez del sistema inmune fetal hasta el final del primer trimestre del embarazo (Muench, 2005).

4.1. TERAPIA CELULAR

4.1.1. Fuentes de células utilizadas en terapia prenatal

Tradicionalmente las células madre hematopoyéticas procedentes de médula ósea adulta han sido las más utilizadas para trasplante tanto en individuos adultos como en neonatos y fetos (Flake, 2004). Pero el pequeño tamaño del feto y las propiedades únicas de las células fetales han permitido ampliar las fuentes de células para trasplantes *in utero* (IUT). En los últimos años las células mesenquimales procedentes de diversos tejidos (médula ósea, tejido adiposo, etc.) se han utilizado en trasplantes postnatales para realizar terapia celular y génica (Porada et al., 2006), y para evitar el desarrollo de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) (Yanez et al., 2006). En terapia prenatal este tipo celular es útil para facilitar el injerto de CMHs o bien para el tratamiento de enfermedades como la osteogénesis imperfecta (Westgren et al., 2003) (Guillot et al., 2008).

A continuación se citan las fuentes de células hematopoyéticas más adecuadas

para trasplante prenatal.

Tejidos fetales: hígado fetal

Existen diferencias notables entre las propiedades biológicas de las células madre adultas y las fetales. A pesar de que se ha comprobado que las primeras son capaces de injertar en un entorno fetal, un gran número de estudios en modelos animales ha demostrado que el uso de células fetales para el trasplante *in utero* es ventajoso (Hayashi et al., 2003) (Oppenheim et al., 2001) (Taylor et al., 2002) (Barker et al., 2001) puesto que están en el mismo estadio del desarrollo que el receptor y tienen un elevadísimo potencial proliferativo (Rebel et al., 1996).

Aunque se han utilizado células procedentes de timo fetal (Touraine et al., 2004) y de sangre fetal (Orlandi et al., 1996) (Shields et al., 2002) para trasplante *in utero*, el tejido fetal más indicado es el hígado fetal, procedente de biopsias hepáticas (ver apartado 4.2) o de bancos de tejidos fetales congelados.

La generación de diferentes linajes de células hematopoyéticas maduras se refleja a nivel molecular por la expresión génica específica del estado de desarrollo y del linaje celular. El modelo mejor estudiado a este respecto es el de la familia de los genes de la β -globina, que están regulados a nivel específico de tejido y de estado de desarrollo (Geiger et al., 1998). Cuando se trasplantan células hematopoyéticas fetales en adultos inmunosuprimidos, éstas comienzan a expresar genes que codifican globinas adultas (Mouchiroud y Blanchet, 1981), lo que indica que el microambiente adulto es capaz de controlar el programa de diferenciación de los progenitores fetales. Por el contrario, las CMHs adultas son incapaces de dar lugar a células T fetales al ser inyectadas en lóbulos tímicos fetales, sugiriendo que las CMHs de hígado fetal tienen un potencial de desarrollo diferente al de las CMHs adultas (Ikuta et al., 1990).

A pesar de que el número de células madre presentes en un hígado fetal humano del primer trimestre de gestación es relativamente bajo comparado con las presentes en otras fuentes de células madre para trasplante, hay que tener en cuenta que representa el mayor reservorio de células madre hematopoyéticas que sostienen toda la hematopoyesis definitiva. Además, en un trasplante *in utero*, al igual que en el trasplante postnatal, puede ser más importante el potencial proliferativo de las células

trasplantadas que el número total infundido (Muench, 2005).

La disponibilidad de tejidos fetales humanos para trasplante está sujeta a restricciones legales. En la actualidad existen bancos de hígados fetales procedentes de abortos (Moretti et al., 1985) (Ek et al., 1993) (Jones et al., 1995) (Mychaliska et al., 1998) (Zhao et al., 2001) y el número de trasplantes realizados con estos tejidos atestigua su seguridad para el IUT (ver apartado 5.1).

Sangre de cordón umbilical

La utilización de sangre de cordón umbilical para trasplante *in utero* es una buena opción ya que las células que contiene se encuentran en un estadio del desarrollo intermedio entre las células fetales y las adultas. Además, la sangre de cordón umbilical se puede almacenar en bancos de células hasta el momento de su utilización para el trasplante en receptores compatibles.

Aunque la sangre de cordón umbilical se ha utilizado en trasplantes postnatales en humanos, aun no se han llevado a cabo trasplantes prenatales debido al elevado número de células T que presenta. Aun no se ha podido determinar con precisión el número de estas células que pueden infundirse en un feto y su efecto en relación a la EICH que podrían producir en el receptor (Muench, 2005).

Médula ósea adulta y sangre periférica

El trasplante *in utero* de médula ósea deplecionada en células T o enriquecida en CD34⁺ procedente de un familiar compatible ha resultado exitoso principalmente cuando se ha realizado en pacientes SCID -X1 (Wengler et al., 1996) (Flake et al., 1996) (Gil et al., 1999) (Bartolome et al., 2002) (Pirovano et al., 2004).

La principal ventaja de usar médula ósea o sangre periférica movilizada procedente de familiares del enfermo es que son donantes relacionados. La principal desventaja es que las diferencias ontogénicas entre las células fetales y las adultas trasplantadas dan ventaja competitiva a las primeras. La menor tasa proliferativa de las células madre adultas también afecta a la permanencia del injerto (Rebel et al., 1996) (Harrison et al., 1997), especialmente cuando el injerto conseguido es bajo.

4.1.2. Trasplante *in utero* de células hematopoyéticas (IUHCT)

El IUHCT ha sido estudiado en diversos modelos animales en los últimos 30 años. El primer éxito experimental se obtuvo en un modelo de ratón anémico al que se le trasplantó médula ósea sana en el día 11 de gestación, mediante una inyección transplacentaria (Fleischman y Mintz, 1979). En estos estudios los eritrocitos del donante reemplazaron a los del ratón anémico consiguiendo corregir los síntomas de la enfermedad. Posteriormente Blazar y colaboradores demostraron que se podía lograr quimerismo multilínaje en ratones anémicos (Blazar et al., 1995a) y reconstitución linfoide en ratones SCID (Blazar et al., 1995a) (Blazar et al., 1995b). De esta manera, en presencia de una deficiencia de linaje, el IUHCT es capaz de reconstituir el linaje defectuoso, pero existe una presión competitiva de los linajes sanos del receptor frente a los del donante. La presencia de una inmunodeficiencia parece ir a favor del injerto. El IUHCT en ratones NOD/SCID, en los que existen defectos en las células NK y en la presentación antigénica (Shultz et al., 1995), dio lugar a injerto multilínaje (Archer et al., 1997). Estos estudios demostraron la conveniencia de la existencia de una ventaja competitiva o una inmunodeficiencia para favorecer el injerto.

Los primeros trasplantes *in utero* de células hematopoyéticas (IUHCT) alogénicas que se realizaron con éxito en animales no enfermos tuvieron lugar en ovejas (Flake et al., 1986) (Zanjani et al., 1992a) (Zanjani et al., 1993) y se obtuvo hasta un 30% de quimerismo multilínaje a largo plazo. Este modelo también permite el injerto xenogénico multilínaje y a largo plazo de células madre hematopoyéticas humanas (Zanjani et al., 1994) (Zanjani et al., 1992b). Recientemente se ha realizado IUHCT en cerdos con resultado exitoso. Se trasplantaron células de médula ósea deplecionadas en células T en cerdos con distinto SLA (antígenos leucocitarios porcinos, *swine leukocyte antigens*) y se obtuvo injerto multilínaje (Lee et al., 2005b) y tolerancia frente a un trasplante alogénico de riñón (Lee et al., 2005a). Los resultados obtenidos en otros modelos animales (mono, cabra y perro) no fueron tan alentadores (Harrison et al., 1989) (Shields et al., 1995) (Pearce et al., 1989) (Blakemore et al., 2004). Los niveles de quimerismo fueron muy bajos, en ocasiones sólo detectables mediante técnicas muy sensibles como la Q-PCR.

Los progresos experimentales más relevantes se han conseguido en ratones, a

pesar de que las primeras aproximaciones mostraron que este modelo es muy resistente al injerto (Carrier et al., 1995) (Donahue y Chen, 2004) (Kim et al., 1998). Se ha logrado quimerismo hematopoyético asociado a tolerancia específica a células de donante tras trasplante *in utero* alogénico (Kim et al., 1998) (Hayashi et al., 2003) (Hayashi et al., 2004). El mejor conocimiento de los requerimientos del injerto (Shaaban et al., 1999) y de los mecanismos de tolerancia (Kim et al., 1999), ha permitido el desarrollo de estrategias en las que se combina IUHCT con trasplante postnatal para lograr niveles muy elevados de quimerismo, superando las barreras inmunológicas en ratón sin necesidad de inmunosupresión o mieloablación (Hayashi et al., 2002) (Peranteau et al., 2002) (Ashizuka et al., 2006). No obstante, a pesar de los avances en IUHCT, los problemas de rechazo asociados no se han resuelto completamente por lo que se están desarrollando estrategias para evitar el uso de células alogénicas.

4.2. TERAPIA GÉNICA EX VIVO

Una posible alternativa para evitar los problemas asociados al trasplante alogénico se basa en la utilización de CMHs autólogas corregidas (Coutelle et al., 1995) (Surbek et al., 2001) (Surbek et al., 2008). El desarrollo de nuevos vectores lentivirales que transducen células quiescentes y de nuevos protocolos que aumentan la eficiencia de transducción ha abierto nuevas perspectivas para la terapia génica en general y para la terapia génica prenatal en particular.

El sistema hematopoyético fetal presenta una serie de características que lo hacen especialmente susceptible a la terapia génica. Durante el estadio fetal las CMHs se encuentran en expansión, en un estado altamente proliferativo, por lo que no es necesario transducir un número muy elevado de células madre para corregir el defecto genético asociado a la enfermedad (Zanjani y Anderson, 1999).

Resultados recientes obtenidos en experimentos de trasplante de células madre en blastocistos de ratón mostraron que la expresión de los genes en las células del donante dependía del estado del desarrollo en el que se encontrara el receptor (Geiger et al., 1998). De esta manera, la expresión de transgenes tras una terapia prenatal

podría estar incrementada con respecto a la expresión después de terapia postnatal, siempre y cuando se trasplantaran células fetales corregidas.

Uno de los principales inconvenientes de la terapia génica prenatal *ex vivo* es la dificultad técnica de obtener células fetales para su corrección y posterior trasplante (Surbek et al., 2002). Recientemente se ha demostrado que la aspiración de células de hígado fetal al comienzo del segundo trimestre de gestación en humanos es factible y proporciona suficientes células madre para poder transducirlas *ex vivo* y trasplantarlas de nuevo en el feto enfermo (Surbek et al., 2002) (Schoeberlein et al., 2004). Además, mediante biopsia de vellosidades coriónicas pueden obtenerse células madre fetales procedentes de la placenta que una vez transducidas con un vector corrector podrían reinfundirse en el feto enfermo (Portmann-Lanz et al., 2006).

Los primeros experimentos de trasplante de células transducidas *in utero* se realizaron en oveja (Kantoff et al., 1989). Se utilizaron células hematopoyéticas fetales procedentes de la sangre, que se infectaron *in vitro* con vectores retrovirales y se reinfundieron en el feto. A los 2 años del trasplante aun se podía detectar el transgén en células hematopoyéticas de sangre periférica. En un modelo canino de mucopolisacaridosis se consiguió injerto de células transducidas pero no mejora de los síntomas de la enfermedad (Lutzko et al., 1999). Casal y Wolfe (2001) trasplantaron *in utero* células de hígado fetal de ratones deficientes en β -glucuronidasa corregidas y pudieron observar la presencia del transgén en tejidos hematopoyéticos, cerebro y riñón. Unos años después Rio y col. (2005) demostraron que células procedentes de médula ósea de ratones singénicos y transducidas *in vitro* eran capaces de generar un injerto estable a largo plazo, multiórgano y multilínea, y de expresar el transgén en ratones sanos. Además, describieron por primera vez que el trasplante de poblaciones de médula ósea transducidas y enriquecidas en progenitores hematopoyéticos daba lugar a niveles de quimerismo más elevados que el trasplante de médula total. En una aproximación muy parecida, Bigger y col. (2006) consiguieron la corrección parcial del fenotipo y la inducción de tolerancia al factor IX de la coagulación en un modelo de ratón con hemofilia.

4.3. TERAPIA GÉNICA *IN VIVO*

En esta aproximación, el vector que contiene el gen corrector se transfiere directamente al feto, produciéndose de esta manera una transducción *in vivo*. La principal ventaja de la transferencia génica directamente al feto es el incremento de transducción de células madre y progenitores hematopoyéticos, ya que estos tipos celulares están en expansión durante el desarrollo fetal. Además, los progenitores transducidos *in utero* pueden dar lugar a tejidos más inaccesibles en individuos adultos (Waddington et al., 2005). En estadio fetal el hígado es el órgano hematopoyético principal, donde se produce la expansión y diferenciación de las CMHs, además está irrigado por los vasos umbilicales y del saco vitelino. Si se realiza una inyección en alguno de estos vasos del vector terapéutico se asegura una buena transducción hepática, cuyos progenitores migrarán y repoblarán médula ósea y bazo, consiguiendo así corregir la práctica totalidad de la hematopoyesis. Tras la administración en modelos animales de vectores lentivirales, concretamente VIH (MacKenzie et al., 2002) o EIAV (Waddington et al., 2003), se ha observado expresión hepática del gen marcador en grupos o focos, lo que sugiere que un único progenitor transducido ha dado lugar a cada uno de los focos.

Con la utilización de vectores integrativos se ha conseguido obtener expresión a largo plazo de genes marcadores y terapéuticos. Se ha reportado expresión estable de un transgén tras la inyección del vector terapéutico en un modelo fetal de oveja (Porada et al., 1998) (Themis et al., 1999) (Tran et al., 2000), y se ha demostrado que la administración de un vector *in utero* es fiable y efectiva en modelos de ratón (Lipshutz et al., 1999) (Gregory et al., 2004). Se han inyectado vectores adenoasociados en ratones con ceguera hereditaria y se ha conseguido mejorar la función retinal y la producción de rodopsina (Dejneka et al., 2004). Mediante inyección de lentivirus en la vena del saco vitelino se ha conseguido corrección permanente en ratones con hemofilia B (Waddington et al., 2004) y expresión específica y a largo plazo de la α -globina humana en tejido eritroide en un modelo de ratón con α -talasemia (Han et al., 2007).

Recientemente, y gracias al desarrollo de nuevos vectores no virales y a las técnicas de electrotransferencia prenatal, se ha conseguido recuperar la funcionalidad

de las células ciliares sensoriales del oído interno en un modelo murino de sordera (Gubbels et al., 2008).

La terapia génica *in vivo*, a pesar de ser técnicamente más sencilla, presenta un riesgo mucho más alto de transferencia génica a la línea germinal. La utilización de promotores específicos de tejido evita la expresión de transgenes exógenos en tejidos no deseados, pero no evita el riesgo de inserciones del vector terapéutico en sitios peligrosos del genoma tanto en células somáticas como germinales. Por este motivo, es necesario seguir utilizando modelos animales para conocer los riesgos de la terapia génica *in vivo* antes de aplicarla en humanos.

4.4. PRINCIPALES RIESGOS ASOCIADOS A LA TERAPIA PRENATAL

La terapia prenatal genera controversia desde el momento en el que el feto comienza a ser un paciente potencial. El momento gestacional en el que el feto comienza a ser un individuo susceptible de ser tratado para la corrección de su enfermedad ha sido y es ampliamente discutido (Fletcher y Richter, 1996). Pero el objetivo de la terapia fetal no es la sustitución de la terapia posnatal, sólo ha de llevarse a cabo en aquellos casos en que la enfermedad diagnosticada ponga en peligro la vida del feto o le deje importantes secuelas no tratables con terapia posnatal. En ocasiones la única alternativa para continuar con un embarazo complicado es la elección de un tratamiento para el feto adecuado (Caplan y Wilson, 2000). En cualquier caso siempre que haya opción de realizar terapia prenatal es necesario sopesar el binomio riesgo-beneficio, de tal manera que la madre no se vea seriamente afectada por el tratamiento y éste no ponga en riesgo la vida del feto más de lo que lo hace la enfermedad que padece (Hayashi y Flake, 2001).

4.4.1. Riesgo fetal y materno

Los riesgos derivados del IUT se dividen en los derivados del procedimiento y los biológicos para la madre y para el feto.

Los riesgos asociados al procedimiento están bastante bien caracterizados puesto que son semejantes a los derivados de CVS, amniocentesis, transfusión o análisis de

sangre fetal. Los riesgos para la madre (p.e. hemorragia, infección, infertilidad) son insignificantes. El riesgo de pérdida fetal antes de las 14 semanas de gestación es menor de un 1% por trasplante *in utero* (Flake y Zanjani, 1997).

Los riesgos biológicos para la madre y el feto incluyen infecciones fúngicas, bacterianas y virales, EICH fetal, sensibilización a Rh para futuros embarazos (si la madre y el feto son Rh⁻ y las células donadoras son Rh⁺), y EICH materna si los linfocitos del donante son capaces de atravesar la barrera placentaria y sobrevivir en la madre (Nelson et al., 1998), aunque no existen datos de que esto último haya ocurrido. Para evitar estos problemas es necesario utilizar muestras libres de agentes infecciosos y deplecionadas en células T. Además, siempre que sea posible, es mejor utilizar muestras procedentes de individuos Rh⁻ o evitar la sensibilización administrando previamente Rh-inmunoglobulina (Flake y Zanjani, 1999).

4.4.2. Riesgos asociados a la terapia génica fetal

El principal riesgo asociado a la terapia génica fetal es el de la transducción de células de la línea germinal del feto. Además existe un riesgo potencial para la madre puesto que el vector podría migrar a través de la placenta e infectar células tanto somáticas como germinales. Este problema sólo se presenta en el caso de la terapia génica *in vivo*. Cuando se transducen CMHs *in vitro* y se reinfunden no hay vector libre que pueda infectar la línea germinal o pasar a la madre por migración transplacentaria (Surbek et al., 2008).

La mutagénesis insercional es un riesgo asociado a la terapia génica de inserción tanto si se realiza *ex vivo* como *in vivo*, en organismos en desarrollo o en organismos adultos.

En todo caso, para valorar mejor las ventajas, la seguridad y los riesgos de la terapia génica fetal, será necesario realizar un mayor número de estudios *in vivo* en modelos animales (Caplan y Wilson, 2000).

5. ENFERMEDADES GENÉTICAS QUE PUEDEN TRATARSE MEDIANTE TERAPIA PRENATAL

Hasta la fecha se ha demostrado que algunas enfermedades como las hemoglobinopatías (ej. Talasemias), los defectos inmunológicos (ej. SCID) o los errores metabólicos congénitos (ej. Síndrome de Hurler, Enfermedad de Krabbe) pueden tratarse mediante trasplante de células madre (Shapiro et al., 2000) . Si el trasplante se realiza antes de que se manifiesten los primeros síntomas de la enfermedad podría evitarse el daño orgánico al que dan lugar (Escolar et al., 2005) (Troeger et al., 2006).

Aunque los mejores resultados se han obtenido en el tratamiento prenatal de las inmunodeficiencias, se ha intentado abordar un amplio rango de síndromes hematológicos y no hematológicos (Surbek et al., 2008). En la tabla III se muestra una relación de enfermedades abordables mediante trasplante prenatal.

Tabla III. Principales enfermedades hereditarias que pueden ser tratadas con terapia prenatal (en negrita se indican aquellas en las que se han realizado trasplantes *in utero* en humanos).

Inmunodeficiencias

Síndrome linfocitario de Bare (Touraine et al., 2004)

Hipoplasia de pelo y cartílago

Síndrome Chediak-Higashi (Diukman y Golbus, 1992) (Cowan y Golbus, 1994)

Granulomatosis crónica (CGD) (Touraine et al., 2004) (Muench et al., 2001)

Síndrome de Kostman

Deficiencia de adhesión leucocitaria

Síndrome de Omenn (Pirovano et al., 2004) (Muench, 2005)

Inmunodeficiencia severa combinada (SCID) (Wengler et al., 1996) (Flake et al., 1996) (Westgren et al., 2002) (Gil et al., 1999) (Bartolome et al., 2002)

Síndrome de Wiskott-Aldrich

Inmunodeficiencia ligada al cromosoma X con hiperinmunoglobulina M

Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X

Hemoglobinopatías y enfermedades de Rh

Porfiria eritropoyética congénita (Enfermedad de Gunther)

a-Thalassemia (Diukman y Golbus, 1992) (Westgren et al., 1996) (Hayward et al., 1998)

b-Thalassemia (Monni et al., 1998) (Orlandi et al., 1996) (Shields et al., 2002)

Anemia falciforme (Westgren et al., 1996) (Shields et al., 2002)

Aloinmunización eritrocitaria (Isoinmunización Rh) (Linch et al., 1986) (Muench, 2005)

Anemia de Fanconi

Enfermedades de almacenamiento enzimático

α -Mannosidosis

Adrenoleucodistrofia

Enfermedad de Fabry

Enfermedad de Farbers

Fucosidosis

Enfermedad de Gaucher

Leucodistrofia de células globoides (Enfermedad de Krabbes) (Bambach et al., 1997) (Leung et al., 1999)

Leucodistrofia metacromática (Slavin et al., 1992)

Mucopolisacaridosis (MPS)-I-H (Síndrome de Hurler)

MPS II (Síndrome de Hunter)

MPS IIIB (Síndrome de Sanfillippo B)

MPS IV-A/B (Síndrome de Morquio)

MPS VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy)

MPS VII (Síndrome de Sly)

Enfermedad de Niemann-Pick (tipos A y B) (Touraine et al., 2004)

Enfermedad de Wolmans

Otros de síndromes genéticos

Deficiencia en Piruvato Kinasa Eritrocitaria

Disqueratosis congénita

Linfohistiocitosis hemofagocítica familiar

Hemofilia A

Osteopetrosis infantil

Osteogenesis imperfecta (Westgren et al., 2003)

Síndrome de Shwachman-Diamond

5.1. EXPERIENCIA CLÍNICA EN TRASPLANTES *IN UTERO* (IUT)

Hasta el momento se han llevado a cabo aproximadamente 50 protocolos de trasplante *in utero* para tratar diversas enfermedades congénitas en los últimos 20 años. Los intentos de terapia prenatal mediante IUT realizados hasta la fecha están citados en la tabla III.

El trasplante *in utero* ha resultado ser exitoso únicamente en el tratamiento de inmunodeficiencias X1 -SCID. Esta enfermedad se caracteriza por la carencia de células T y NK debida a una mutación en CD132, la cadena γ del receptor común de citoquinas. En los cinco casos de X1 -SCID en los que se ha realizado IUT se ha logrado reconstitución de células T y células NK. Es importante señalar que en los casos de X1 -SCID y en un caso de SCID por mutación en la cadena α del receptor para la interleuquina 7 (IL7RA), la reconstitución de las células T fue policlonal, lo que indica que procedían de células T que se habían desarrollado en el feto a partir de progenitores procedentes del donante, y no por expansión de células maduras presentes en el trasplante (Pirovano et al., 2004). También se ha observado reconstitución de células T en un caso de SCID con células NK ($T^- B^+ NK^+$) de etiología desconocida (Gil et al., 1999). De esta manera, el trasplante *in utero* para SCID da lugar a una rápida restauración de la respuesta inmune humoral, lo que demuestra una ventaja potencial de la terapia prenatal frente al trasplante posnatal, en donde se produce un considerable retraso en la reconstitución inmune (Haddad et al., 1998).

Otros tipos de inmunodeficiencias parecen más resistentes al injerto tras trasplante prenatal. Los pacientes SCID con deficiencia en células B (Síndrome de Omenn) no han sido trasplantados *in utero* de manera exitosa puesto que el déficit celular tiene lugar demasiado tarde en el desarrollo y las células infundidas no tienen ventaja con respecto a las del receptor (Pirovano et al., 2004). Esta misma explicación se puede aplicar al Síndrome de Chediack -Higashi y a la Granulomatosis Crónica. Ambos desórdenes afectan a la función, no a la producción de células hematopoyéticas, de forma que las células trasplantadas no tienen espacio para injertar o bien no presentan ventaja proliferativa frente a las células del receptor (Muench et al., 2001).

El trasplante *in utero* también se ha realizado en 20 casos de hemoglobinopatías e

isoimmunización por Rh con escaso o ningún beneficio clínico. En los casos en los que se ha detectado quimerismo (α -talasemia, β -talasemia, anemia de células falciformes e isoimmunización por Rh), éste ha sido insuficiente para disminuir los síntomas de la enfermedad.

En pacientes de talasemia, a pesar de que las células madre sanas no presentan ventaja proliferativa frente a las enfermas, los eritrocitos derivados de las células sanas sí presentan una ventaja significativa frente a las células rojas del individuo enfermo. Por este motivo no son necesarios niveles muy elevados de quimerismo en pacientes con talasemia ya que las células del donante contribuyen en mayor medida al conjunto de eritrocitos circulantes. Se estima que el quimerismo necesario para disminuir significativamente los efectos de la talasemia es de un 10 -20% (Persons et al., 2001)

En el caso de la hemofilia A se han obtenido elevados niveles de quimerismo trasplantando hígado fetal *in utero* durante el primer año de vida, si bien el objetivo real de este protocolo no era el de reponer el sistema hematopoyético del paciente con células corregidas sino exponer al feto al factor VIII para realizar un futuro tratamiento con factor VIII en un individuo tolerizado en estadio fetal (Touraine et al., 2004).

Para el tratamiento prenatal de la osteogénesis imperfecta se han trasplantado células mesenquimales de hígado fetal y se ha detectado un 5% de osteoblastos derivados del donante a los 8 meses de edad (Westgren et al., 2003). Pero aun está por determinar si las células mesenquimales son capaces de superar las barreras de injerto con mayor facilidad que las células madre hematopoyéticas.

No existe ningún tipo de experiencia clínica con células transducidas y reinfundidas *in utero*, pero se han llevado a cabo protocolos de terapia génica en recién nacidos que llevan a pensar en la eficacia clínica de la terapia génica prenatal. El trasplante de células madre corregidas procedentes de sangre de cordón umbilical (Kohn et al., 1998) en neonatos con deficiencia en ADA ha permitido la transducción estable con el vector corrector, pero no dio lugar al efecto terapéutico deseado. En el caso de la infusión de médula ósea autóloga corregida en neonatos con SCID γ -X1 (Cavazzana-Calvo et al., 2000) se consiguió el efecto terapéutico deseado.

En la presente memoria nos hemos centrado en el desarrollo de un modelo murino

de trasplante de células hematopoyéticas procedentes de hígado fetal transducidas con lentivirus para su aplicación en terapia génica prenatal. Como modelos de enfermedad hemos trabajado con ratones modelo de Anemia de Fanconi (FA-D1), una enfermedad en la que se ven afectadas las células madre hematopoyéticas, y ratones deficientes en Piruvato Quinasa Eritrocitaria, una enzimopatía eritrocitaria.

5.2. ANEMIA DE FANCONI

La Anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad recesiva, autosómica y ligada al cromosoma X en el grupo de complementación FA⁻B, que se enmarca dentro del grupo de enfermedades genéticas de baja prevalencia. Se caracteriza por fallo de la médula ósea, anomalías congénitas y una alta predisposición al cáncer, principalmente a leucemia mieloide aguda (LMA). Las células deficientes en alguno de los genes de la ruta de AF presentan defectos en la reparación del ADN y elevada inestabilidad cromosómica, siendo altamente sensibles a agentes entrecruzantes del ADN, como la mitomicina C (MMC) y el diepoxibutano (DEB). Estas características permiten el diagnóstico de la enfermedad en una gran proporción de los pacientes mediante la detección de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica tras la exposición a MMC o DEB (Giampietro et al., 1998). En la figura 4 se muestran las 13 proteínas implicadas en la ruta de AF descritas hasta el momento (Mirchandani y D'Andrea, 2006) (Reid et al., 2007).

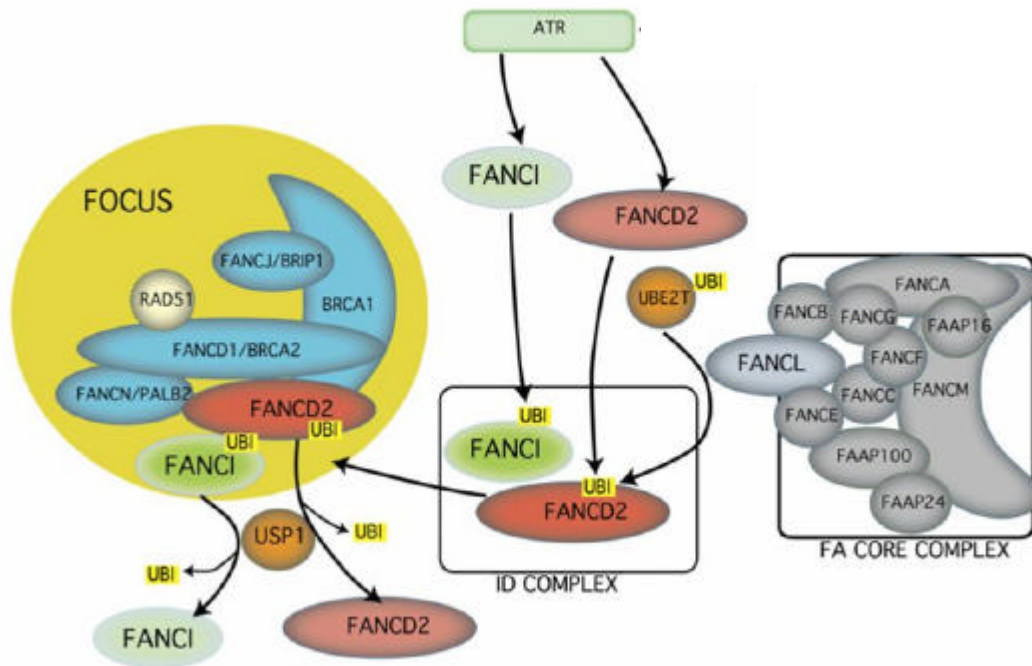


Figura 4. Modelo de interacción de las proteínas implicadas en la ruta bioquímica de Fanconi. [Tomado de (Grompe y van de Vrugt, 2007)].

Actualmente existen 12 modelos murinos de AF. En 2002 se publicó un trabajo realizado en nuestro laboratorio en el que se describe el fenotipo hematológico de un ratón deficiente en *Fanca* (Cheng et al., 2000) (Rio et al., 2002), que resultó ser menos agresivo que el observado en pacientes. En 2006, Navarro y col. describieron por primera vez un defecto muy significativo en la proliferación de las CMHs en su entorno natural fisiológico en un modelo murino de AF-D1 (*Brca2*) (McAllister et al., 2002) (Navarro et al., 2006).

La deficiencia en cualquier de los genes de la ruta de AF podría ser corregida mediante la introducción de la forma correcta del gen en las células deficientes. Las alternativas terapéuticas actuales para enfermos de AF se basan en el tratamiento con andrógenos, con factores de crecimiento hematopoyético, transfusiones y el trasplante de progenitores hematopoyéticos que constituye, cuando es posible, el tratamiento de elección. Se han iniciado tres protocolos clínicos de terapia génica para la AF sin que

por el momento se hayan conseguido beneficios clínicos (Kelly et al., 2007) (Liu et al., 1999) (Walsh et al., 2001). En todos ellos la estrategia consistió en la transducción de progenitores hematopoyéticos con vectores retrovirales que portaban los genes *FANCA* o *FANCC* y que posteriormente se infundieron a pacientes no acondicionados.

5.3. DEFICIENCIA EN PIRUVATO KINASA ERITROCITARIA

La piruvato kinasa es la enzima responsable del último paso de la glicolisis y cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato, generándose dos moléculas de ATP. En el eritrocito esta ruta es muy importante porque es su fuente principal de energía. La deficiencia en Piruvato Kinasa (DPK) es la causa más común de anemia hemolítica no esferocítica crónica.

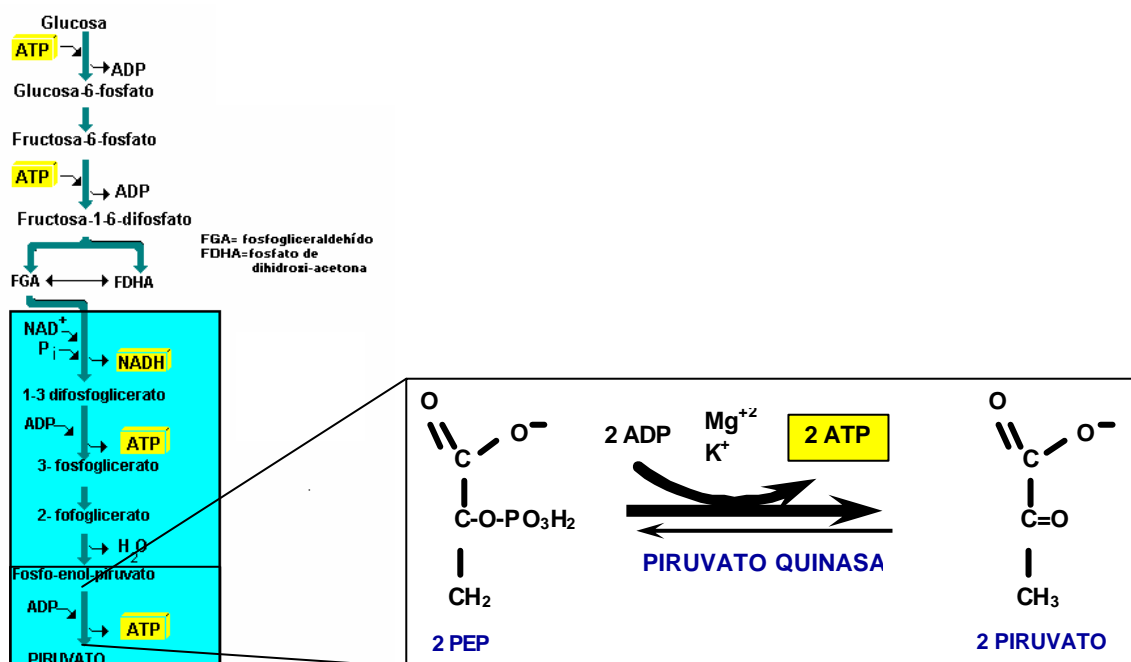


Figura 5. Esquema de la ruta de la glicolisis. En detalle se observa el paso de fosfoenolpiruvato a piruvato mediada por la enzima piruvato quinasa.

La DPK es un desorden autosómico recesivo producido por mutaciones en el gen *pklr*, que codifica la piruvato quinasa eritrocitaria. Este gen en humanos está localizado en el cromosoma 1 y codifica dos isoformas diferentes controladas por promotores

específicos de tejido. La isoforma R, que se expresa específicamente en eritrocitos, y la isoforma L que se expresa en hígado, riñón e intestino. La prevalencia de esta enfermedad no está claramente determinada, pero se estima que es de entre 5 y 50 individuos por millón en la raza caucásica. La severidad clínica y la supervivencia de los pacientes están asociadas con el tipo de mutación encontrada. En la mayoría de los casos severos, los tratamientos son principalmente esplenectomía y/o trasplante de progenitores hematopoyéticos. Estas características hacen que las formas severas de esta enfermedad sean candidatas a ser tratadas por terapia génica.

En la actualidad existen varios modelos caninos y de ratón de DPK en los que se ha conseguido tratar la enfermedad de manera exitosa. En perros deficientes en piruvato quinasa se ha conseguido corregir la anemia hemolítica secundaria a la deficiencia enzimática mediante trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénicos sin acondicionamiento previo (Zauch et al., 2001). En la cepa de ratón CBA/N-*PK-1^{slc}/PK-1^{slc}* no ha sido necesario acondicionamiento para corregir la anemia mediante trasplante de médula ósea procedente de ratones sanos congénicos (Morimoto et al., 1995). En nuestro laboratorio, se ha conseguido inducir expresión de RPK humana en ratones sanos (Meza et al., 2007) y se ha corregido el fenotipo anémico en ratones DPK de la cepa AcB55 (Meza et al., enviado para revisión) aplicando un protocolo experimental de terapia génica *ex vivo*. Este modelo de ratón deficiente fue generado por Min-Oo y col., que intentando obtener un modelo animal de resistencia a malaria, generaron un ratón con una mutación en el gen *pkir* (Min-Oo et al., 2003). Esta cepa presenta disminución de los niveles de eritrocitos en sangre, así como de la hemoglobina y el hematocrito y un dramático incremento en reticulocitos circulantes, semejando el fenotipo de los pacientes DPK. Estos ratones constituyen una herramienta muy útil para evaluar la eficacia de la terapia prenatal para el tratamiento de la DPK.

6. INMUNIDAD PRENATAL

Actualmente existe controversia respecto a la existencia de una respuesta inmune que afecte al injerto tras un trasplante alogénico *in utero*. Existen evidencias indirectas

de la existencia de esta respuesta, pero a pesar de ello aun hay un grupo importante de investigadores que sostienen que la inmadurez inmunológica del feto no es compatible con la existencia de una reacción inmune contra el injerto. La realidad clínica es que los únicos trasplantes *in utero* exitosos han tenido lugar en individuos con algún tipo de inmunodeficiencia en los que las células del donante presentan ventaja proliferativa sobre las del receptor (Flake et al., 1996) (Touraine et al., 1989) (Touraine, 1992) (Westgren et al., 2002) (ver apartado 5.1).

Las poblaciones de células T inmunológicamente activas en el feto humano han sido observadas en periodos relativamente tempranos de la gestación. El hígado fetal contiene células NK y células T que han experimentado reordenamiento del TCR y son alorreactivas al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) *in vitro* (Renda et al., 2000) (Toivanen et al., 1981) (Lindton et al., 2003) (Lindton et al., 2000). Recientemente se han observado células de la madre en tejidos fetales que podrían estar contribuyendo a una respuesta inmune (Gotherstrom et al., 2005). Por último, estudios recientes han demostrado que en fetos inmunosuprimidos el injerto observado es 5 veces superior al observado en fetos no inmunosuprimidos (Shields et al., 2004).

Históricamente, el argumento que se imponía para sostener la no existencia de respuesta inmune fetal es que no había evidencias de una ventaja de injerto de células singénicas frente a alogénicas (Howson-Jan et al., 1993) (Fleischman y Mintz, 1984) (Carrier et al., 1995). Pero el bajo quimerismo conseguido y la mínima incidencia de injerto en estos estudios suponen que la interpretación del comportamiento del injerto de células madre hematopoyética *in utero* sea complicada (Merianos et al., 2008). No obstante, todos estos experimentos se realizaron mediante inyección intraperitoneal. La inyección intravascular en la vena del saco vitelino permite el trasplante de un número más elevado de células, permitiendo el injerto en un número mayor de fetos. Peranteau y col. demostraron la posible existencia de una reacción inmune en el feto inyectando en la vena del saco vitelino células hematopoyéticas en dos modelos experimentales murinos, uno alogénico y otro singénico (Peranteau et al., 2007). En ambos casos se observaron niveles similares de injerto a las dos semanas del trasplante. Sin embargo, 5 semanas después de la inyección sólo un 30% de los animales que recibieron el trasplante alogénico conservaban el quimerismo y lo mantuvieron a largo plazo, mientras que el 100% de los animales sometidos al

trasplante singénico mantuvieron el quimerismo a largo plazo. Estos experimentos evidencian la existencia de una respuesta inmune que podría deberse tanto a algún componente de la inmunidad innata como a una respuesta inmune adaptativa. A las dos semanas postrasplante, tanto los animales alogénicos como los singénicos mostraron niveles detectables de quimerismo, por lo que la pérdida de injerto parece un fenómeno postnatal, lo que apoya la existencia de una respuesta inmune adaptativa subsiguiente al trasplante *in utero*, cuyos mecanismos aun no han sido definidos. Se ha hipotetizado (Merianos et al., 2008) que las células T reactivas del donante escapan de la selección tímica, a causa de una presentación inadecuada o demasiado tardía de los antígenos del donante en el timo. Estas células provocan rechazo del injerto o son sometidas a una respuesta reguladora periférica por parte del huésped, análoga a los mecanismos periféricos reguladores que controlan los clones autorreactivos que escapan de la selección tímica en individuos normales. Esta hipótesis concuerda con los datos de Peranteau y col. que apoyan la existencia de una delección clonal parcial de las células T reactivas del donante en animales injertados y que es consistente con mecanismos conocidos de autotolerancia (Peranteau et al., 2006).

Aunque el trasplante autólogo de células hematopoyéticas no esté restringido por la existencia de una respuesta inmune, la expresión de transgenes en las células trasplantadas puede generar respuesta inmune en los receptores (Lutzko et al., 1999). Así, se ha descrito que células que expresan transgenes generan respuesta citotóxica cuando se trasplantan en animales inmunocompetentes (Stripecke et al., 1999) (Izembart et al., 1999). Concretamente se ha descrito que la EGFP, muy utilizada como gen marcador, es una proteína muy inmunogénica cuando se expresa en células tumorigénicas inyectadas en ratones (Stripecke et al., 1999) y se ha demostrado que genera respuesta citotóxica y humoral en primates no humanos (Rosenzweig et al., 2001). Por otra parte, está demostrada la inducción de tolerancia cuando se expresan genes exógenos de una manera estable en CMH (Puig et al., 2002) (Morris et al., 2004). Varios estudios muestran la supervivencia a largo plazo de CMH transducidas con genes exógenos y trasplantadas, en ratones (Schiffmann et al., 1995) (Kang et al., 2001), perros (Carter et al., 1992) y primates no humanos (Heim et al., 2000) (Berger et al., 2001) (Rosenzweig et al., 1999), sometidos a acondicionamiento reducido o incluso no acondicionados. No obstante, hasta el momento se desconoce si la

expresión de esos genes exógenos en células hematopoyéticas singénicas genera una respuesta inmune tras un trasplante prenatal.

OBJETIVOS

1. El trasplante *in utero* es una alternativa al trasplante postnatal para el tratamiento de enfermedades genéticas hereditarias que puedan diagnosticarse durante el desarrollo fetal. Con el objeto de utilizar esta técnica para el tratamiento de enfermedades genéticas hereditarias que afecten al sistema hematopoyético nos planteamos la aplicación de dos aproximaciones terapéuticas basadas en el trasplante *in utero* en ratón:
 - Terapia celular mediante trasplante alogénico *in utero* de progenitores hematopoyéticos de médula ósea.
 - Terapia génica mediante trasplante singénico *in utero* de progenitores hematopoyéticos de hígado fetal transducidos *ex vivo* con vectores lentivirales.
2. Por otra parte, nos planteamos comprobar la eficacia del trasplante *in utero* de progenitores hematopoyéticos, sanos o corregidos genéticamente, para revertir el fenotipo patológico de dos modelos animales de enfermedad:
 - Un modelo experimental de AF-D1, basado en una mutación hipomórfica en el gen *Brca2*.
 - Un modelo de ratón deficiente en piruvato quinasa eritrocitaria (DPK).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de diferentes cepas para los diferentes estudios:

- Trasplantes alogénicos: Balb/c y C57BL/6J.
- Trasplantes singénicos: C57BL/6J x DBA/2 F1 (B6D2F1, expresando el marcador panleucocitario murino Ly 5.2) y B6SJL -*Ptprc*^{a/b}*Pep*^{3b}/BoyJ x DBA/2 F1 (P3D2F1, expresando tanto Ly5.1 como Ly5.2).
- Modelos de enfermedades genéticas:
 - Anemia de Fanconi subtipo D1 (*Brca2*): ratones con fondo genético Balb/C que presentan una delección en el dominio COOH terminal del gen *FancD1/Brca2* (exón 27), cedidos por la Dra. K.A. McAllister.
 - Deficiencia en Piruvato Kinasa Eritrocitaria (DPK): B19 (ratones AcB55 que presentan una mutación puntual en el nucleótido 269 (T→A) del gen *pkfr*), procedentes de Emerillon Therapeutics Inc. (Montreal, Quebec, CANADA).

Las parejas reproductoras originales de cada cepa fueron obtenidas de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, MA, EEUU). Su cría y su mantenimiento se llevaron a cabo en el Servicio del Animalario del CIEMAT (Centro de Usuarios de Animales de Experimentación N° 28079 -21A). Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de aire filtrado a través de filtros Hepa, humedad relativa ($55 \pm 15\%$) y temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, alimentación *ad libitum* con pienso UAR A04 (UAR, Villemoisson-sur-orge, Francia) y agua de bebida irradiada con luz ultravioleta con, al menos, 4 p.p.m. de cloro residual libre.

El estado de salud de los animales se controló rutinariamente mediante análisis en animales centinelas, de acuerdo con los procedimientos recomendados por FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*). Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a la legislación europea y española vigente sobre el uso y tratamiento de animales de experimentación (RD 233/88 y O.M. 13-10-89 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y Convenio Europeo 1-2-3 del 18/3/1986) y de acuerdo a los principios éticos y de bioseguridad de nuestro centro. Asimismo, todos los procedimientos de irradiación siguieron los criterios y normas de Protección Radiológica que recoge la legislación vigente (Reglamento

sobre Instalaciones Nucleares y Radiactivas Real Decreto 1836/1999 de 3 de Diciembre; Reglamento sobre Protección Sanitaria contra Radiaciones Ionizantes Real Decreto 783/2001 de 6 de Julio).

2. VECTORES DE TRANSFERENCIA GÉNICA

2.1. VECTORES GAMMA-RETROVIRALES

2.1.1. Generación de líneas productoras y sobrenadantes retrovirales utilizando la línea celular empaquetadora *Phoenix-Eco*

La producción de sobrenadantes γ -retrovirales con capacidad de transducir células murinas se realizó utilizando la línea celular empaquetadora *Phoenix-Eco* (Número de la ATCC: SD 3444). Esta es una línea empaquetadora de retrovirus de segunda generación diseñada para la obtención de retrovirus de alto título de forma transitoria o estable (<http://www.stanford.edu/group/nolan>). Fue obtenida por modificación de la línea 293 T que deriva de riñón de embrión humano y está transformada con el adenovirus E1a. Las células 293T portan el antígeno T, sensible a temperatura, cuya presencia permite la replicación episomal de los plásmidos que contienen el origen de replicación y la región promotora temprana del SV40, lo que le confiere una mayor eficacia de transfección. La línea *Phoenix-Eco* fue creada incluyendo las construcciones capaces de generar las proteínas virales necesarias para el empaquetamiento de los plásmidos de interés, gag-pol, y las proteínas de la envuelta ecotrópica (Ragheb et al., 1995).

Para la obtención de las líneas productoras se sembraron las células *Phoenix-Eco* en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, Gibco-BRL) suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino, Bio-Whittaker), 1% de L-glutamina 200 mM (Gibco) y 0,5% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 10.000 μ g/ml, Gibco), a una concentración de 5×10^5 células/pocillo (de 9,6 cm^2). Transcurridas 24 horas las células alcanzaron un 70-80% de confluencia y se transfectaron con el vector monocistrónico

SF11GtxEGFP (que contiene un IRES (del inglés, internal ribosome entry site) (Gtx) y un fragmento que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP)) o el vector bicistrónico SF11RPKXEG (que contiene el ORF del gen humano de la piruvato kinasa R, un IRES (del inglés, internal ribosome entry site) (Gtx) y un fragmento que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP)) (Figura 6) utilizando Eugene (Roche Diagnostics Corp.) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las células transfectadas se mantuvieron en cultivo durante dos semanas. Después de ese tiempo únicamente aquellas células en las que el vector Ψ -retroviral se había integrado mantuvieron la expresión del transgén. La expresión de la EGFP como gen marcador nos permitió seleccionar dicha población celular, utilizando un separador celular EPICS Elite ESP (Coulter, Hialeh, FL) hasta alcanzar un porcentaje de células positivas para el transgén del 98%. Las células seleccionadas se expandieron y se mantuvieron congeladas hasta su utilización.

SF11GtxEGFP



SF11RPKXEG



Figura 6. Plásmidos de transferencia para la producción de vectores Ψ -retrovirales.

Para producir los sobrenadantes infectivos se procedió a la descongelación de la línea productora generada. Tras 4 días de expansión se retiró el medio de cultivo (DMEM suplementado) y se añadió IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's médium, Bio-Whittaker) suplementado con FBS (Bio-Whittaker), 1% de L-glutamina 200 mM (Gibco) y 0,5% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 10.000 $\mu\text{g/ml}$, Gibco). A las 24 h se recogió el sobrenadante y se volvió a añadir IMDM suplementado fresco, repitiéndose este proceso cada 24 h hasta las 96 h. Los sobrenadantes así obtenidos en días consecutivos se filtraron por 0,45 μm , para eliminar los restos celulares, y fueron utilizados para transducir los progenitores hematopoyéticos.

2.1.2. Titulación de sobrenadantes gamma-retrovirales

La titulación de los sobrenadantes retrovirales se realizó utilizando la línea celular fibroblástica embrionaria murina 3T3 (Número de ATCC: CRL -1658). Se sembraron 5×10^4 células en pocillos de $1,9 \text{ cm}^2$ en 500 μl de DMEM suplementado. Al día siguiente se retiró el medio, se añadieron 200 μl de diluciones crecientes del sobrenadante viral a analizar y se contó el número de células en uno de los pocillos para determinar el número de células a infectar. Una vez incubadas las células durante 24 h se retiró el sobrenadante γ -retroviral y se añadieron 500 μl de medio fresco. Pasadas 48 h las células se tripsinizaron y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células expresando el transgén marcador (EGFP). El título del sobrenadante γ -retroviral se calculó de la siguiente manera:

$$T = \frac{\text{Nº de células}^* \times \% \text{ células EGFP}^+}{100} \times FC \times FD$$

donde:

T, es el título del sobrenadante γ -retroviral.

* número de células en el momento de la infección.

FC: Factor de corrección para expresar el título en virus/ml, en el caso de que el volumen en el que se lleve a cabo la infección no sea un volumen final de 1 ml (p.e., para una infección en un volumen final de 200 μl , FC=5)

FD: Factor de dilución. Dilución utilizada del sobrenadante.

2.2. VECTORES LENTIVIRALES

2.2.1. Generación de sobrenadantes lentivirales

En la presente memoria se han utilizado vectores lentivirales de tercera generación, autoinactivantes y sin capacidad de generar virus replicativos (Zufferey et al., 1998). Para la producción de sobrenadantes lentivirales se cotransfectaron transitoriamente células 293T (Número de la ATCC: CRL-11268) con 4 plásmidos diferentes (Figura 7).

Esta línea celular procede de epitelio de riñón humano y lleva insertado el gen sensible a la temperatura que codifica para el antígeno T del SV40.

Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

1. Vector de transferencia pRRLs in18.PPT.CMV.eGFP.Wpre. Contiene una delección en la LTR 3' que hace que las partículas virales producidas tengan las LTR inactivadas (Zufferey et al., 1998), la proteína verde fluorescente (EGFP) como gen marcador y el promotor interno del Citomegalovirus (CMV) que dirige la expresión de esta última. Además, el vector tiene secuencias reguladoras como el tracto de la polipurina (PPT) (Follenzi et al., 2000) y el elemento pre-regulador del virus de la hepatitis de la marmota (Wpre).

2. Plásmido pMD2.VSV.G. Contiene una secuencia que codifica para la proteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Los virus pseudotipados con esta envuelta entran en la célula interaccionando con fosfolípidos de la membrana, lo que hace que puedan infectar una gran variedad de tipos celulares. Además esta envuelta da mucha estabilidad a la partícula viral lo que permite concentrarlos y almacenarlos.

3 y 4. Plásmidos empaquetadores pMDLg-pRRE y pRSV-REV. Expresan los genes gag, pol y rev (gag codifica para la proteína de la matriz p17, del antígeno "core" p24, de la nucleocápside p7; pol/codifica para la transcriptasa inversa p51 y p66, la integrasa p32 y la proteasa p11 y env codifica la glicoproteína 120 y 41).

Las construcciones necesarias para la producción de estos vectores fueron cedidas por el Dr. Naldini (San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy - "Vita-Salute San Raffaele" University Medical School, Milán, Italia).

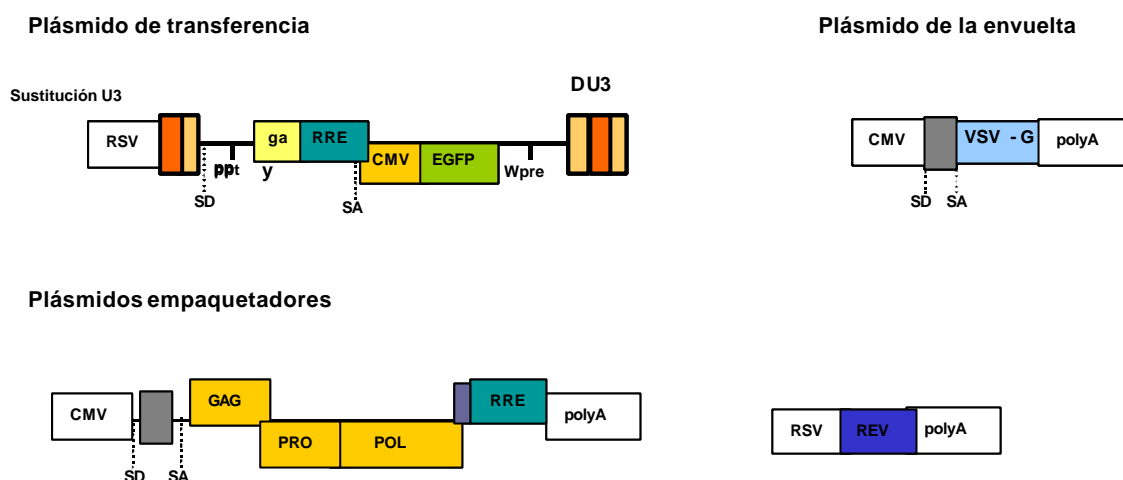


Figura 7. Construcciones para la producción de vectores lentivirales.

Las células 293T se sembraron a una densidad de 18×10^6 células por placa de 150 cm^2 en placas pretratadas con gelatina al 0,2% para favorecer su adhesión a la placa de cultivo. El medio de cultivo usado fue IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Bio-Whittaker), 1% de L-glutamina 200mM (Gibco) y 0,5% de penicilina/estreptomicina (10.000 $\mu\text{g/ml}$, Gibco). Cuando las células alcanzaron el 60 -70% de confluencia (a las 24 h de cultivo), se cambió el medio de cultivo por medio fresco y se realizó la cotransfección de los 4 plásmidos utilizando fosfato cálcico (Graham y van der Eb, 1973; Bacchetti y Graham, 1977). Para ello se mezclaron los ADNs plasmídicos con 0,1X TE:H₂O (2:1) hasta completar un volumen final de 1,125 ml y se añadieron 125 μl de CaCl_2 2,5 M. Las cantidades que se añadieron por placa de cada plásmido fueron las siguientes: 32 μg de pRRLsin18.PPT.CMV.GFP.Wpre, 12,5 μg de pMDLg-pRRE, 6,25 μg de pRSV-REV y 7 μg de pMD2.VSV.G. Esta mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos y transcurrido este tiempo se le añadieron, gota a gota en agitación continua, 1,250 ml de 2X HBS (HEPES 100 mM (GibcoBRL); NaCl 281 mM; Na₂HPO₄ 1,5 mM; pH 7,13), para conseguir así formar precipitados de Ca^{2+} -ADN⁻ en una solución salina de fosfatos. Cuando se añaden los precipitados a las células 293T se forman agregados que son endocitados por las mismas. El tamaño y la calidad del precipitado es crítico para el éxito del proceso, que se ve afectado por factores tales como

pequeños cambios en el pH de la solución. A las 14 horas de la transfección, se sustituyó el medio con los precipitados por medio fresco.

Los sobrenadantes con las partículas virales infectivas se recogieron entre 24 y 30 horas después de l cambio de medio, se filtraron por 0,45 μm para eliminar restos celulares y se concentraron las partículas virales mediante ultracentrifugación a 20.000 rpm durante 2 h en una centrífuga Avanti J30I (Beckman Coulter) en rotor L24.38. Los virus sedimentados se resuspendieron en PBS y se almacenaron a -80°C .

2.2.2. Titulación de sobrenadantes lentivirales

El título de los sobrenadantes lentivirales se determinó mediante el análisis de la expresión de EGFP en células de la línea HT1080 (Número de la ATCC: CRL-12012) procedente de fibrosarcoma humano.

Se sembraron 5×10^4 células HT1080 /pocillo de $1,9 \text{ cm}^2$ en 1 ml de DMEM suplementado. Al día siguiente se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes y se infectaron con ellas las células. En el momento de la infección se contaron las células de uno de los pocillos. A las 24 h se retiró el medio con el sobrenadante lentiviral y se añadió 1 ml de medio fresco. Una semana después de la infección se recogieron las células y se analizaron mediante citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células que expresaban EGFP.

El título se calculó teniendo en cuenta el número de células en el momento de la infección y el porcentaje de transducción (% EGFP) a una dilución adecuada (vease la fórmula utilizada para el cálculo del título viral en la página 45).

Los títulos obtenidos estuvieron en un rango de entre 1×10^8 y 1×10^{10} partículas infectivas/ml.

3. PURIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES HEMATOPOYÉTICAS

3.1. PURIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES HEMATOPOYÉTICAS DE MÉDULA ÓSEA

Para la obtención de las células de médula ósea (MO) se sacrificaron ratones de 6 semanas de edad por dislocación cervical y se recogieron los fémures y las tibias. La MO se obtuvo perfundiendo los huesos con medio IMDM (Iscove Modified Dulbecco Medium, Bio -Whittaker, Europe; Verviers, Bélgica) utilizando jeringas de 1 ml con agujas de 0,5 x 16 mm. Seguidamente se añadió solución de lavado (PBS 1X, 0,5% BSA y 2 mM EDTA) y se centrifugaron las células durante 10 minutos a 1400 rpm.

Las células linaje negativas (Lin^-) se seleccionaron utilizando un kit de depleción de linajes hematopoyéticos (Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotec., Germany)), y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las células obtenidas se marcaron con una mezcla de anticuerpos unidos a biotina frente a marcadores de linajes hematopoyéticos (B220, CD11b, Gr1, Ter119 y CD5). Tras 15 minutos de incubación a 4°C se añadió un anticuerpo secundario frente a biotina (Anti -biotin Microbeads) unido a microesferas magnéticas y se incubó 20 minutos a 4°C. Para la selección inmunomagnética se utilizaron columnas de tipo MS (Miltenyi Biotec, Germany) y se recogió la población linaje negativa que se lavó finalmente con solución de lavado y se resuspendió en PBS o medio de cultivo.

La pureza de la población se analizó mediante citometría de flujo y osciló entre un 80 y un 98%, con una recuperación de entre un 30 y un 60 % de las células Lin^- totales.

Para la purificación de la población $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ se marcó la población linaje negativa previamente seleccionada con un anticuerpo anti -Sca-1 unido a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec, Germany), se incubó durante 30 minutos y se recogió la población positiva utilizando una columna de selección inmunomagnética (Miltenyi Biotec, Germany).

Para deplecionar la MO de células T se incubó con un anticuerpo anti-CD3 unido a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec, Germany) durante 20 minutos. La muestra

marcada se pasó por una columna de selección inmunomagnética (Miltenyi Biotec, Germany) y se recogió la fracción negativa.

3.2. PURIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES HEMATOPOYÉTICAS DE HÍGADO FETAL

Para obtener las células hematopoyéticas de hígado fetal se sacrificaron hembras en el día 14,5 de gestación y se recogió el hígado de cada uno de los fetos, se disgregaron con ayuda de una jeringa de 1 ml y se procedió al lavado de las células con solución de lavado.

Para obtener la población linaje negativa enriquecida en progenitores hematopoyéticos fetales se utilizó el Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotec., Germany) y se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1. La pureza de la población linaje negativa y el porcentaje de recuperación fueron similares a los obtenidos en la purificación de progenitores procedentes de médula de individuos adultos.

Para la purificación de la población $\text{Lin}^- \text{AA4.1}^+$ se marcaron las células de hígado fetal total con un anticuerpo anti-AA4.1 (BD Pharmingen), característico de progenitores hematopoyéticos de este tejido (Jordan et al., 1990), durante 30 minutos y se realizó una selección inmunomagnética de las células AA4.1^+ , que se marcaron de nuevo con anticuerpos característicos de los distintos linajes hematopoyéticos. Para obtener una población más enriquecida en progenitores, se realizó una selección de células linaje negativas dentro de la población AA4.1^+ para lo que se utilizó un separador celular (Figura 8).

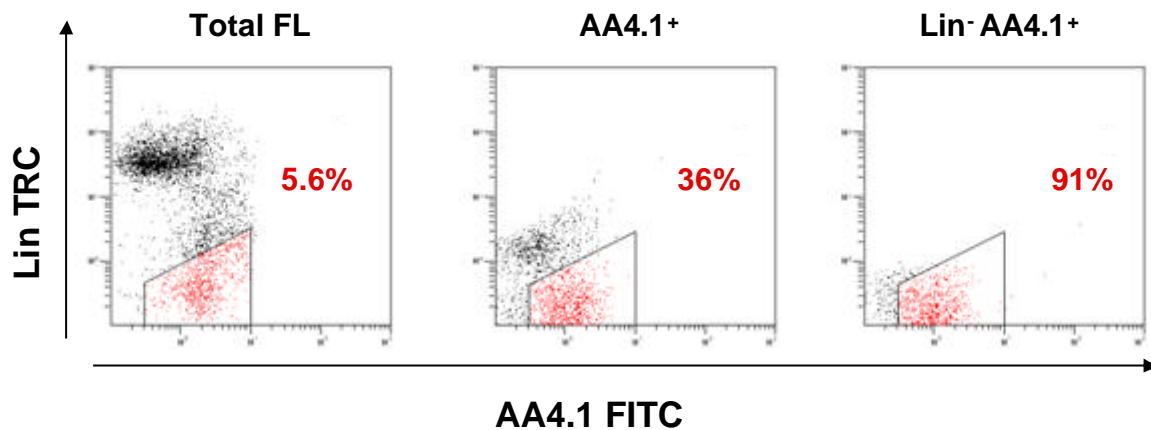


Figura 8 Enriquecimiento progresivo en progenitores hematopoyéticos de hígado fetal. Se utilizó un separador celular para seleccionar la población Lin^- presente en la población AA4.1^+ .

La población enriquecida en progenitores hematopoyéticos fetales obtenida se resuspendió en PBS para inyectarla seguidamente en los receptores adecuados, o en medio de cultivo para trasducirla con lentivirus.

4. INFECCIÓN *IN VITRO* DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CON VECTORES VIRALES

4.1. TRANSDUCCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CON VECTORES GAMMA-RETROVIRALES

Previamente a la infección con los vectores γ -retrovirales, las células Lin^- se preestimularon durante 48 horas en IMDM con 20% de FBS, hIL-11 (100 ng/ml) (R&D systems) y mSCF (100 ng/ml) (R&D systems). La infección se realizó en placas de Petri previamente recubiertas con el fragmento CH-296 de la fibronectina y precargadas con virus. El recubrimiento con el fragmento CH-296 de la fibronectina se realizó incubando la placa con $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CH-296 (Retronectin, Takara Shuzo, Otsu, Japón) durante 12h y su posterior lavado con BSA 2% (w/v) en PBS (Hananberg et al., 1996). Las precargas de virus se hicieron añadiendo sobrenadante nuevo cada 30 minutos hasta un total de 3 cambios de sobrenadante (Hananberg et al., 1997). A

continuación se resuspendieron 5×10^4 células Lin⁻/ml de sobrenadante γ -retroviral fresco suplementado con FBS (20%), hIL-11 (100 ng/ml) y mSCF (100 ng/ml) y se cultivaron en las placas previamente recubiertas con el vector. Se realizaron infecciones cada doce horas mediante recambio de medio y adición de nuevo sobrenadante infectivo hasta un total de cuatro ciclos de infección. Cuatro horas después de la última infección las células se recogieron utilizando solución de disociación (Gibco) y se analizó la eficacia de transducción y la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células transducidas.

4.2. TRANSDUCCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CON VECTORES LENTIVIRALES

Las células Lin⁻ de hígado fetal se pusieron inmediatamente en cultivo en placas pretratadas o no con retronectina. El medio utilizado fue IMDM suplementado (10% de FBS (Bio-Wittaker), 1% de L-glutamina 200mM (Gibco) y 0.5% de penicilina/estreptomicina (10.000 µg/ml, Gibco). Se utilizaron dos combinaciones diferentes de factores de crecimiento que se añadieron al medio de cultivo: hIL-11 (100 ng/ml) y mSCF (100 ng/ml); o Flt3 (100 ng/ml) (Miltenyi Biotech), mSCF (100 ng/ml) y hTPO (300 ng/ml) (R&D systems).

El estado hiperproliferativo de los progenitores hematopoyéticos de hígado fetal hace que no sea necesario un periodo largo de pre-estimulación. Por este motivo la transducción se realizó 24 horas después de la purificación en columna de las células Lin⁻ o inmediatamente después de la misma. Los sobrenadantes lentivirales del vector se añadieron al medio de cultivo durante 3, 6 ó 24 horas y se utilizaron dos valores de MOI diferentes (5 y 10 virus/célula). Transcurrido el tiempo de infección se lavaron las células y se resuspendieron en PBS para trasplantarlas o en medio de cultivo para su seguimiento *in vitro*.

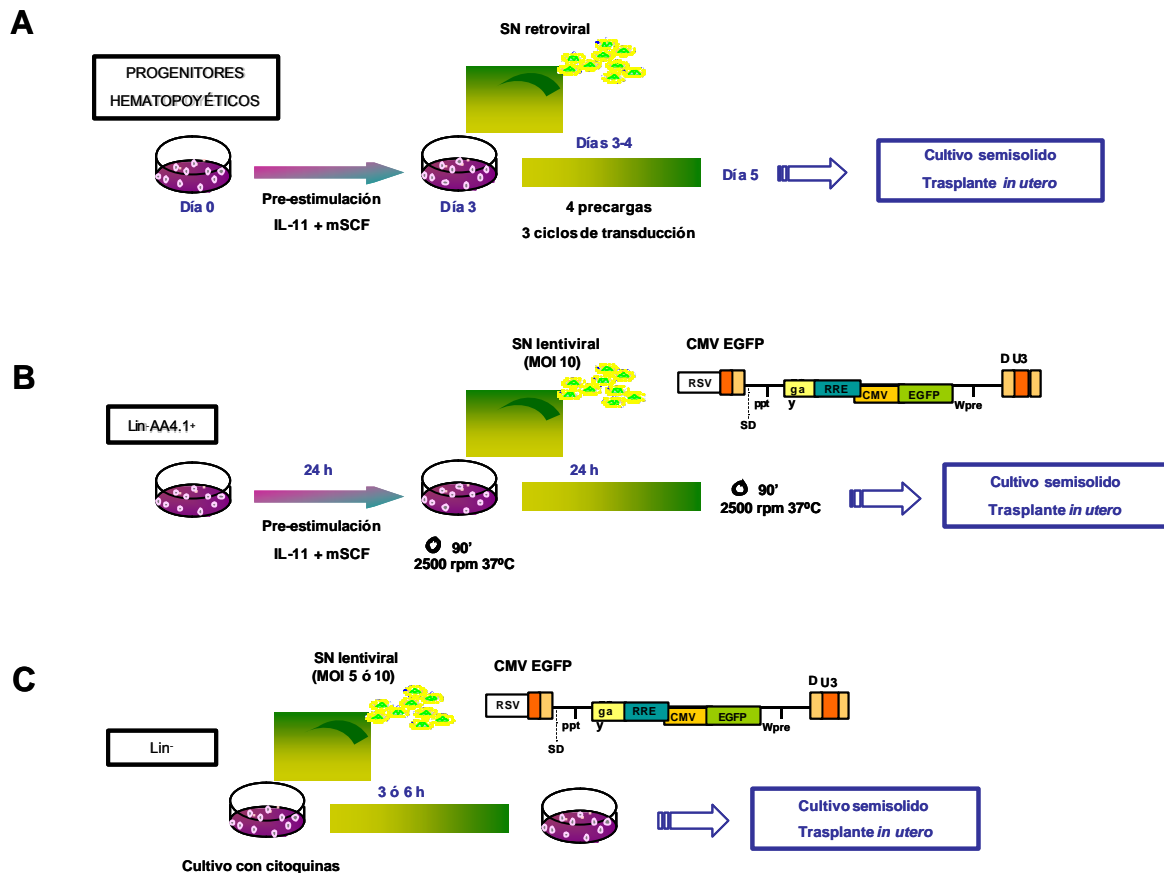


Figura 9. Protocolo experimental para la transducción de progenitores hematopoyéticos con vectores virales. A) Protocolo utilizado con vectores γ -retrovirales; **B)** Protocolo utilizado con vectores lentivirales incluyendo 24 horas de pre-estimulación; **C)** Protocolo utilizado con vectores lentivirales sin pre-estimulación.

5. ENSAYOS CLONOGÉNICOS

Para analizar la capacidad clonogénica de células Lin^- de médula ósea y de hígado fetal se sembraron 500 células/placa. El medio utilizado para evaluar las CFU-GM fue MethoCult GF M3534 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canadá) cuya composición es 1% de metilcelulosa en medio IMDM (BioWhittaker), 15% de suero bovino fetal, 1% de albúmina de suero bovino, 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina pancreática bovina, 200 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina humana (saturada en hierro), 10 mM de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 50ng/ml de mSCF, 10 ng/ml de rmlL-3 y 10 ng/ml de rhIL-6. Las

muestras se cultivaron a 37°C al 5% CO₂ y 90% de humedad. Siete días después se contó el número de colonias al microscopio (tamaño mínimo 50 células por colonia). En los casos en los que se sembraron células trasducidas con vectores γ -retrovirales o lentivirales se contó tanto el número de colonias totales como el número de colonias que expresaban EGFP.

6. TRASPLANTE *IN UTERO*

El trasplante *in utero* se realizó en hembras en el día 14,5 de gestación, siendo el día 0 el momento de la formación del tapón vaginal. Se utilizó anestesia inhalatoria (isoflurano) y cuando los animales estaban completamente dormidos se les realizó una laparotomía en la línea media. Con ayuda de un par de isopos estériles se extrajeron los cuernos uterinos de la madre y se trasplantó a cada uno de los fetos por vía intraperitoneal. Para la inyección se utilizó un microcapilar de 100 μ m de diámetro estirado y afilado en bisel con un ángulo de 15°. El volumen de solución celular inyectado fue de 5 μ l/feto. Durante todo el proceso quirúrgico se mantuvieron los fetos debidamente hidratados con PBS y se observó cuidadosamente la temperatura de la madre. Finalmente se reintrodujeron los cuernos uterinos en la cavidad abdominal de la madre y se procedió a suturar con sutura reabsorbible Ethicon PDS II 5/0 (Johnson & Johnson, Bruselas, Bélgica). En todas las intervenciones se utilizó Buprenorfina (Buprex) como analgésico. Se inyectaron por vía subcutánea 100 μ l/20 g de peso a cada una de las hembras operadas.

Para los diferentes experimentos se utilizaron diferentes poblaciones celulares más o menos enriquecidas en progenitores hematopoyéticos y células madre hematopoyéticas. El número de células a inyectar por feto varió dependiendo de la población celular a inyectar, intentando mantener en todos los casos la cantidad de células primitivas inyectadas por feto. De esta manera se inyectaron 2-3x10⁴ células Lin⁻Sca1⁺ o Lin⁻AA4.1⁺, 2-5x10⁵ células Lin⁻ y 1-5x10⁶ células de médula total deplecionada en células T.

Los ratones trasplantados fueron analizados periódicamente para el seguimiento del injerto.

7. TRASPLANTE SINGÉNICO EN RATONES ADULTOS IRRADIADOS LETALMENTE

Células Lin⁻ purificadas de hígado fetal de ratones P3D2F1 (Ly5.1/Ly5.2) en el día 14 de gestación se transdujeron con sobrenadantes lentivirales según el protocolo anteriormente descrito y se trasplantaron en ratones B6D2F1 (Ly5.2) de entre 6 y 8 semanas de edad irradiados letalmente con dos dosis de 5 Gy espaciadas 4 horas.

A los 3 meses después del trasplante los receptores primarios se sacrificaron y se obtuvieron las células de médula ósea que una vez lavadas se resuspendieron a una concentración de $1-5 \times 10^6$ células/200 μ l de PBS y se trasplantaron en receptores secundarios B6D2F1.

Para los trasplantes secundarios de animales trasplantados *in utero*, se sacrificaron los ratones injertados con células Lin⁻ de hígado fetal procedentes de ratones P3D2F1 a los 180 días post-nacimiento y se trasplantó su médula en receptores B6D2F1 letalmente irradiados.

8. GENOTIPADO DE RATONES BRCA2

Para genotipar los ratones trasplantados *in utero* se obtuvieron fibroblastos a partir de la piel de la oreja y se cultivaron en DMEM suplementado con 20% FBS, 1% de glutamina y 0,5% de penicilina/estreptomicina. Se extrajo el ADN de 1×10^6 células usando el DNeasy Tissue kit (Qiagen GmbH) y se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real en un Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia). El diseño de los oligonucleótidos y las sondas se llevó a cabo con ayuda del software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Para el genotipado de los ratones con la mutación hipomórfica en el gen *Brca2* se utilizó un sistema de doble amplificación en el que se usaron dos parejas de oligonucleótidos: QFBrca27 5'-GGAATAAGAGCATGAATGTTTGGC-3' y QRBrca27 5'-AAAATACCTATACACCAACAGGACACC-3', para amplificar el gen *Brca2* WT; y

Brca2_KOF 5' -AGCATACATTATACGAAGTTATGATCCC-3' y Brca2_KOR 5' -GCCTGTGTGCATGACTTTGGTA-3' para amplificar el gen *Brca2*^{D27/D27}. Para detectar la amplificación por qPCR se utilizó *Power SYBR® Green qPCR Mastermix UDG* (*Applied Biosystems*). La amplificación utilizando los primers para el gen *Brca2* WT y el gen *Brca2*D27/D27 se realizó en reacciones independientes por la similitud en las curvas de melting obtenidas.

Las condiciones usadas para la amplificación del ADN por Q-PCR fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 50°C, seguido de 10 min de desnaturalización a 95°C y 45 ciclos con tres partes: 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 10 s.

La detección de la fluorescencia se realizó mediante el análisis de la curva de melting de 60-95°C, aumentando 0,4 grados centígrados en cada paso.

9. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

9.1. DESCALCIFICACIÓN DE RATONES RECIÉN NACIDOS

Para llevar a cabo los análisis histológicos se sacrificaron los ratones al día siguiente del nacimiento. Se les realizó un corte sagital para dividirlos en dos partes iguales y las muestras se embebieron en formalina 10% durante al menos 12 h. Transcurrido este tiempo se colocaron las muestras en solución de descalcificación (10 g de citrato sódico, 25 ml de ácido fórmico al 90%, 75 ml de agua destilada) durante un mínimo de 16 horas. Una vez completada la descalcificación, las muestras se lavaron en agua durante 6-8 h, realizando cambios periódicos.

Finalmente se procedió a incluir las muestras en parafina (Merck) para su conservación y análisis.

9.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE NEONATOS PARA LA EVALUACIÓN DE EICH

El estudio histológico se basó en el análisis de la estructura en secciones sagitales de 5 μm de grosor de ratones recién nacidos, incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina. Las secciones se desparafinaron introduciéndose durante 30 minutos en una estufa a 54°C y se eliminaron los posibles restos de parafina mediante inmersión en *Histo-Clear* (National Diagnostics, Hesse Hull, Reino Unido). Después se hidrataron mediante inmersiones consecutivas en concentraciones decrecientes de etanol (Scharlau Chemie, Barcelona, España) desde 100%, 95%, 70%, 50% (v/v) y finalmente en agua. Seguidamente, se tiñeron con una solución de hematoxilina (*Gill-2 Haematoxylin*, Thermo, Pittsburg, EEUU) para teñir los núcleos celulares y se lavaron con agua. A continuación se sumergieron en 4% (v/v) de ácido acético (Scharlau Chemie), que se diluyó con otra inmersión en agua antes de introducirlos en *Bluing Reagent* (Thermo). Para teñir el citoplasma celular, se sumergieron en etanol 95%, pasándose luego a eosina (*Eosin y Alcoholic*, Thermo). Finalmente se deshidrataron en etanol 95%, 100% e *Histo-Clear*, antes de realizar el montaje con cubreobjetos en *Xylene Substitute Mountant* (Thermo).

10. ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS

Se extrajo la sangre periférica (SP) de los ratones a analizar mediante un corte en la cola y se recogió sobre EDTA 0,5 M para evitar su coagulación. En un analizador hematológico Abacus Junior Vet (Diatron, Budapest, Hungría) se realizó el conteo del número de leucocitos totales por mililitro de SP, y el porcentaje correspondiente a las distintas poblaciones hematopoyéticas, como son, granulocitos, monocitos, células linfoides, plaquetas y hematíes. Además se midieron los niveles de hemoglobina y hematocrito en ratones B19 trasplantados *in utero*.

11. ANÁLISIS DE QUIMERISMO

11.1. CITOMETRÍA DE FLUJO

La sangre de los animales trasplantados se analizó cada 30 días a partir de la cuarta semana postrasplante o postnacimiento, hasta un máximo de 180 días. Para obtener la sangre se realizó una incisión en la cola y se extrajo un máximo de 200 μL en presencia de EDTA (0,5 M, pH 8) para impedir su coagulación. Para lisar los eritrocitos se añadió solución de lisis (0,155 mM NH_4Cl + 0,01 mM KHCO_3 + 10^{-4} mM EDTA) y tras un lavado con PBA (PBS 1x + 0,1 % BSA [p/v] + 0,02% NaN_3) se procedió al marcaje con diferentes anticuerpos monoclonales durante 30 minutos, a 4°C y en oscuridad.

Para los trasplantes alogénicos se utilizó el anticuerpo H2K^b conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Pharmigen, Palo Alto, CA) para reconocer las células procedentes del donador B6 y el anticuerpo H2K^d conjugado con ficoeritrina (PE; Pharmigen) que reconoce las células del receptor Balb/c.

En los trasplantes singénicos las células fueron marcadas con un anticuerpo anti Ly5.1-PE (Pharmingen) para reconocer las células del donante. Cuando las células estaban transducidas también se analizó el porcentaje de células que expresaban EGFP para determinar el porcentaje de transducción.

En el momento del sacrificio de los animales se obtuvieron la MO y el bazo que se lisaron y se marcaron con los anticuerpos previamente descritos para estudiar el quimerismo en diferentes órganos. Asimismo, las células se marcaron con los anticuerpos monoclonales B220, Mac-1, Gr-1 y CD3 biotinilados (Pharmingen), para identificar las diferentes poblaciones hematopoyéticas, y con el anticuerpo secundario estreptavidina-TRC (Caltag).

Después del marcaje las células se resuspendieron en una solución de PBA conteniendo 2 mg/mL de yoduro de propidio (IP) para excluir las células no viables en el análisis. Los análisis se realizaron en un citómetro de flujo EPICS XL (Coulter

Electronics). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el CXP software (Beckman Coulter Inc.).

11.2. Q-PCR

El análisis del fondo endógeno en receptores hembra trasplantados se realizó mediante Q-PCR específica contra una región altamente repetida del cromosoma Y (SRY). Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación fueron F-SRY 5' - VTGTTTCAGCCCTACAGCCACA-3', y R-SRY 5' -CCTCTCACCACGGGACCAC-3'; la sonda Taqman SRY-T, 5'-FAM ACAATTGTCTAGAGAGCATGGAGGGCCA-BHQ1-3'. En la reacción multiplexada además se amplificó como control de ADN genómico la β -actina de ratón. Los oligonucleótidos utilizados fueron F-m- β -actina: 5' - ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3V, y R-m- β -actina: 5' - ACTATGGCCTCAAGGAGTTTTGTCA-3'; para detectar la amplificación se utilizó la sonda Taqman, S-m- β -actina: 5' -TR AACGAGCGGTTCCGATGCCCT -BHQ2-3'. El programa de la Q-PCR fue de un ciclo de 10 min a 95°C seguido de 55 ciclos con dos partes: 95°C 20 s, 58°C 30 s.

Los resultados se analizaron relativizando los valores obtenidos al valor de una muestra de un ratón macho no quimérico.

12. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL TRANSGEN POR Q-PCR

Para determinar el número de copias del provirus integrado por célula, se amplificó una secuencia que se encuentra dentro del fragmento RRE presente en el provirus. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar esta región fueron F_RRE 5' - ATCTCTAGCAGTGGCGCCC-3' y R_RRE 5' -CTGCGTCGAGAGAGCTCCTC-3'. La sonda utilizada para detectar la presencia del amplicón correspondiente al fragmento RRE fue una sonda con secuencia 5' -6FAM-CAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACC-BHQ1-3'. La amplificación se llevó a cabo

mediante un ciclo de 10 minutos a 95°C seguido de 50 ciclos con dos pasos: 95°C 30 segundos y 58°C 30 segundos.

En todos los casos la cuantificación se realizó interpolando los datos obtenidos en una curva de plásmido, diferente para cada uno de los amplicones. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se incluyeron controles negativos, tanto de muestras sin ADN como de muestras de ADN sin transducir.

13. CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE VARIACIÓN DE POBLACIONES ERITROIDES

La cuantificación de la variación celular en las diferentes subpoblaciones eritroides fue calculada siguiendo el desarrollo matemático descrito previamente (Beauchemin et al., 2004). El porcentaje de pérdida celular (CL) en una subpoblación se calculó usando la siguiente ecuación:

$$CL = 1 - [(P_{i+1}^{exp} \times P_i^{control}) / (P_i^{exp} \times P_{i+1}^{control})] \times 100$$

$P_i^{control}$: porcentaje de células en la población inicial en un ratón control

P_i^{exp} : porcentaje de células en la población inicial en ratones DPK

$P_{i+1}^{control}$: porcentaje de células en la población control subsiguiente

P_{i+1}^{exp} : porcentaje de células en la población DPK subsiguiente

Para calcular la variación celular relativa (RCV) entre dos estadíos consecutivos de diferenciación se aplicó la siguiente fórmula:

$$RCV = - (CL \times P_i^{exp} / 100)$$

Los valores positivos de RCV corresponden a ganancias celulares relativas y valores negativos a pérdidas relativas.

14. ESTUDIOS DE RESPUESTA INMUNE

14.1. REINMUNIZACIÓN DE RATONES TRASPLANTADOS *IN UTERO*

A los 180 días postnacimiento se inyectaron 5 µg de proteína verde fluorescente recombinante (rEGFP, Biovision Research Products, CA, USA) en la base de la cola de ratones trasplantados *in utero* con objeto de observar respuesta inmune primaria o secundaria en función de si se habían visto expuestos o no a la EGFP en estadio fetal. La proteína se diluyó en un volumen final de 200 µl de PBS y se inyectó a través de una de las venas caudales.

Se extrajo sangre de estos animales cada dos días y hasta el día 20 después de la inyección de rEGFP. La sangre se centrifugó durante 10 minutos a 3000g para obtener el suero que se congeló a -20°C hasta el momento de su utilización.

14.2. RESPUESTA HUMORAL FRENTE A EGFP

La detección de anticuerpos anti -EGFP se realizó mediante ELISA directo. Sobre una placa de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc -Immuno™ Plate, NUNC) se incubó la proteína verde fluorescente recombinante (rEGFP, Biovision Research Products, CA, USA) a una concentración de 3 µg/ml en tampón carbonato -bicarbonato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 16 horas a 4°C. El bloqueo de los sitios libres se realizó con PBS-5% BSA durante 1 hora a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS - 0.05% Tween. Los sueros del día 0 y los obtenidos a lo largo de la inmunización se diluyeron en tampón de bloqueo e incubaron durante una hora a 37°C. La detección de los anticuerpos anti -EGFP se realiza usando un anticuerpo anti -IgG o anti -IgM marcado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se incubaron las placas 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavaron tres veces con PBS-0,05% Tween. Se reveló con 100 µl del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Pierce). Se incubaron las placas 30 minutos a temperatura ambiente y se interrumpió la reacción añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 0.18 M, midiéndose la absorbancia a

450 nm (Genios -TECAN). Se consideró un resultado positivo cuando la señal específica superó al menos en dos veces la absorbancia del control negativo. Como control negativo se utilizó una mezcla de sueros procedentes de ratones del mismo fondo genético que los que se estaban estudiando.

14.3. RESPUESTA CELULAR FRENTE A EGFP

La respuesta celular específica frente a la proteína verde fluorescente (EGFP) fue seguida mediante un ensayo de proliferación y secreción de interferón gamma (INF γ).

14.3.1. Ensayo de proliferación

Los bazo de los ratones se procesaron por disgregación mecánica usando el procesador de tejido GentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotech), según las instrucciones del fabricante. Los esplenocitos se aislaron usando un gradiente de densidad sobre Ficoll (Lymphoprep) y se resuspendieron en RPMI 1640 (Gibco) con 10% de suero fetal, 1% de glutamina (Gibco), 1% de antibiótico (Gibco) y 5 UI/ml de IL-2 murina recombinante (Gibco) a una densidad de 2×10^6 /ml. Se plaquero 200.000 esplenocitos en placas de 96 pocillos con fondo en U (Nunc). A cada pocillo se añadió 10 μ g/ml de EGFP. La placa se incubó 37°C y 5% CO₂. A los 3 días se retiraron 100 μ l del medio y se añadió igual volumen de medio completo con IL-2 a una concentración final de 10 UI/ml. Las placas se incubaron dos días más, recogiendo 100 μ l de sobrenadante para valorar la producción de INF γ . Posteriormente, se añadió 1 μ Ci de timidina tritiada (GE Healthcare UK Limited) a cada pocillo, procediéndose 18 horas más tarde a recoger las células en filtros de fibra de vidrio con un sistema OMNIFILTER-96 HARVESTER (PerkinElmer). La radioactividad retenida en los filtros se midió por centelleo líquido en un contador modelo TriCarb (Wallac). Se estudió igualmente la capacidad de respuesta de las células tras estimulación con 10 μ g/ml de fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich) tras tres días de cultivo y un pulso idéntico con el precursor radioactivo.

14.3.2. Detección de INF-gamma

Para valorar la producción de INF γ se empleó un ELISA de la casa comercial Bender MedSystem (Mouse IFN- γ , Bender MedSystem). El ELISA se desarrolló según las instrucciones del fabricante. Brevemente, los sobrenadantes procedentes del ensayo de proliferación se incubaron junto con un anticuerpo anti γ -INF de ratón conjugado con biotina durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación (200 rpm). Se lavaron las placas con PBS + 1% Tween20. A continuación se incubaron las placas con 100 μ l de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano. Tras 1 hora de incubación, se lavaron las placas tres veces y se determinó la enzima absorbida con 100 μ l del sustrato 3,3',5,5'tetrametilbenzidina (TMB). Se incubaron las placas durante 10 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente. Se paró la reacción añadiendo 100 μ l de ácido fosfórico 1 M, midiéndose la absorbancia a 450 nm (Genios-Tecan).

15. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se representan como la media aritmética \pm error estándar de la media. La significación de las diferencias se determinó utilizando el test no paramétrico Wilcoxon Mann-Whitney. Para las comparaciones múltiples se utilizó el test ANOVA. El procesamiento y los análisis estadísticos fueron realizados con el soporte del programa informático Statgraphics Plus (STATGRAPHICS Plus 5.0, Enterprise Edition, Statistical Graphics Corp., Minitab Inc., Rockville, MD, Estados Unidos).

RESULTADOS

1. APROXIMACIONES DE TERAPIA CELULAR MEDIANTE TRASPLANTE *IN UTERO* DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS ALOGÉNICAS

En la mayoría de los modelos de trasplante *in utero* en ratón se han utilizado células procedentes de médula ósea deplecionadas o no en células T. Debido al pequeño tamaño del feto del ratón, no es posible trasplantar las células intraperitonealmente en un volumen mayor de 5 µl, por lo que el enriquecimiento de la población donadora en progenitores y CMH permitiría aumentar el injerto y la supervivencia de los fetos trasplantados. Para este fin nos propusimos desarrollar un modelo de terapia celular prenatal con células alogénicas purificadas en ratón.

Se utilizaron como receptores ratones Balb/c (H2K^d) y como donadores ratones C57Bl/6 (H2K^b). Las células procedentes de la médula ósea de los ratones donadores se purificaron para obtener diferentes poblaciones enriquecidas en progenitores según el protocolo descrito en material y métodos (ver sección 3.1) y se trasplantaron intraperitonealmente en fetos en el día 14,5 de gestación.

Como se puede observar en la tabla IV, los porcentajes de supervivencia de los animales trasplantados con las diferentes poblaciones de células alogénicas fueron sensiblemente más bajos que cuando se trasplantaron células singénicas procedentes de médula ósea. Por otra parte, cuanto mayor grado de purificación tenía la población inyectada *in utero* menor porcentaje de supervivencia se obtenía. Los porcentajes de quimerismo obtenidos a los 30 días postnacimiento no diferían de los observados en los trasplantes singénicos pero, en la mayor parte de los casos, los trasplantes alogénicos no lograron mantener el quimerismo a largo plazo.

Tabla IV. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos *in utero*.

CÉLULAS TRASPLANTADAS	Nº CÉLULAS/FETO	Nº NACIDOS (Nº INYECTADOS)	% SUPERVIVENCIA (Nº SUPERVIV.)	% INJERTADOS* (Nº INJERTADOS)	% QUIMERISMO (rango)
TTE SINGÉNICO cél. Sca1 ⁺	2-3x10 ⁵	37 (62)	60 (37)	30 (11)	0,19 (0,1 - 0,36)
BM depleccionada en células T	5x10 ⁶	15 (26)	27 (7)	100 (7)	0,43 (0,31 - 1,63)
Sca1 ⁺	2-3x10 ⁵	5 (8)	25 (2)	50 (1)	0,17
Lin-Sca1 ⁺	2-3x10 ⁴	12 (88)	2 (2)	100 (2)	0,12
Sca1 ⁺ y mesenquimales	2-3x10 ⁵ / 5x10 ⁴	14 (31)	16 (5)	20 (1)	0,10
Lin-Sca1 ⁺ y mesenquimales	2-3x10 ⁴ / 5x10 ³	0 (25)	0 (0)	-	-
mesenquimales	5x10 ³	4 (29)	7 (2)	0 (0)	-

En la tabla se muestra un resumen de los diferentes tipos de trasplante alogénico realizados. También se incluye el resultado de trasplantes singénicos de células Sca1⁺ de médula ósea. El quimerismo indicado en la tabla corresponde al observado 30 días después del nacimiento.

* (nº injertados / nº superviv.) x 100

Transcurridos entre 7 y 10 días después del nacimiento, pudimos observar que un 10% de los ratones trasplantados morían. Estos ratones tenían un menor tamaño que sus compañeros de camada y presentaban una coloración cutánea más oscura. Para determinar si estos ratones estaban muriendo a causa de EICH, se realizaron cortes histológicos sagitales y se observó la morfología epitelial. Se pudieron observar infiltraciones linfocitarias epidérmicas y dérmicas, así como infiltraciones de células polimorfonucleares en la dermis, características de ratones afectados por EICH (Figura 10).

Para evitar una posible enfermedad injerto contra huésped que podría ser la causante del descenso de la supervivencia en los trasplantes alogénicos, inyectamos células mesenquimales, cuyo potencial inmunosupresor ha sido demostrado en nuestro laboratorio (Yañez et al., 2006), junto con la población procedente del donante. No se observó, sin embargo, un aumento de la supervivencia, ni se mejoró el porcentaje de injerto exógeno (Tabla IV).

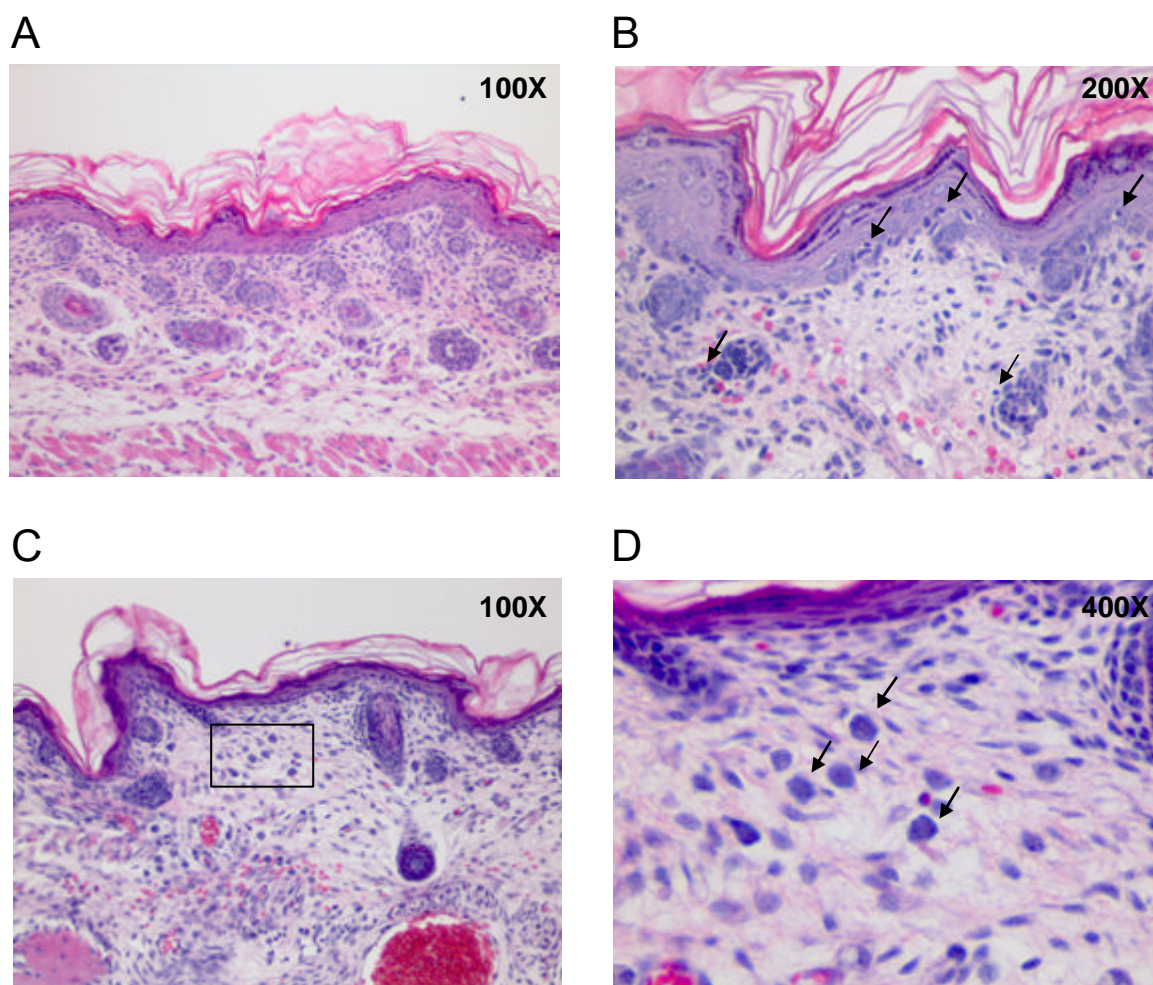


Figura 10. Cortes histológicos de ratones recién nacidos trasplantados *in utero* con células $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+$ alogénicas. Microfotografías de secciones de epitelio teñidas con hematoxilina-eosina que muestran histología característica de EICH. **A)** Microfotografía correspondiente a un ratón control sin trasplantar. **B)** Microfotografía correspondiente a un ratón que presenta infiltraciones linfocitarias en dermis y epidermis. **C)** y **D)** Microfotografías correspondientes a un ratón con infiltración de polimorfonucleares en dermis (ver recuadro y flechas) a diferentes aumentos.

2. OPTIMIZACIÓN DEL MARCADO GENÉTICO DE LA HEMATOPOYESIS MEDIANTE TRASPLANTE *IN UTERO* DE CÉLULAS DE HÍGADO FETAL TRANSDUCIDAS CON VECTORES LENTIVIRALES

Aunque se había demostrado previamente, tanto en ratones adultos irradiados (Bowie et al., 2007) como en fetos (Hayashi et al., 2003), la capacidad de injerto de poblaciones de hígado fetal enriquecidas en progenitores hematopoyéticos, quisimos comprobar si era posible reproducir los resultados publicados con nuestras condiciones experimentales. Con objeto de reconstituir la hematopoyesis de ratones mediante el trasplante de CMHs procedentes de hígado fetal no transducidas, en una primera aproximación, se realizó una selección inmunomagnética de células linaje negativas y se trasplantaron en ratones adultos y en fetos en el día 14,5 de gestación.

Se irradiaron letalmente 5 animales adultos B6D2F1 (Ly5.2 / Ly5.2) y se trasplantaron con 3×10^5 células lin⁻ procedentes de hígado fetal de ratones P3D2F1 (Ly5.1 / Ly5.2). Para determinar el porcentaje de injerto que presentaban estos ratones, se realizaron extracciones periódicas de sangre, a los 30, 60, 90 y 180 días postrasplante. En todos los casos, los porcentajes de quimerismo observados superaron el 90%, lo que indicó que estas células eran capaces de reconstituir la hematopoyesis de ratones adultos sometidos a mieloablación tanto a corto como a largo plazo.

Para evaluar la capacidad de injerto de los progenitores hematopoyéticos de hígado fetal *in utero*, se trasplantaron intraperitonealmente un total de 17 fetos de los cuales sobrevivieron 7. Los análisis de quimerismo en los fetos trasplantados se realizaron a los mismos tiempos que en ratones adultos. Todos los ratones presentaron porcentajes de microquimerismo de entre un 0,15% y un 4%, que se mantuvieron hasta el final del experimento (día 180 postrasplante) (Figura 11).

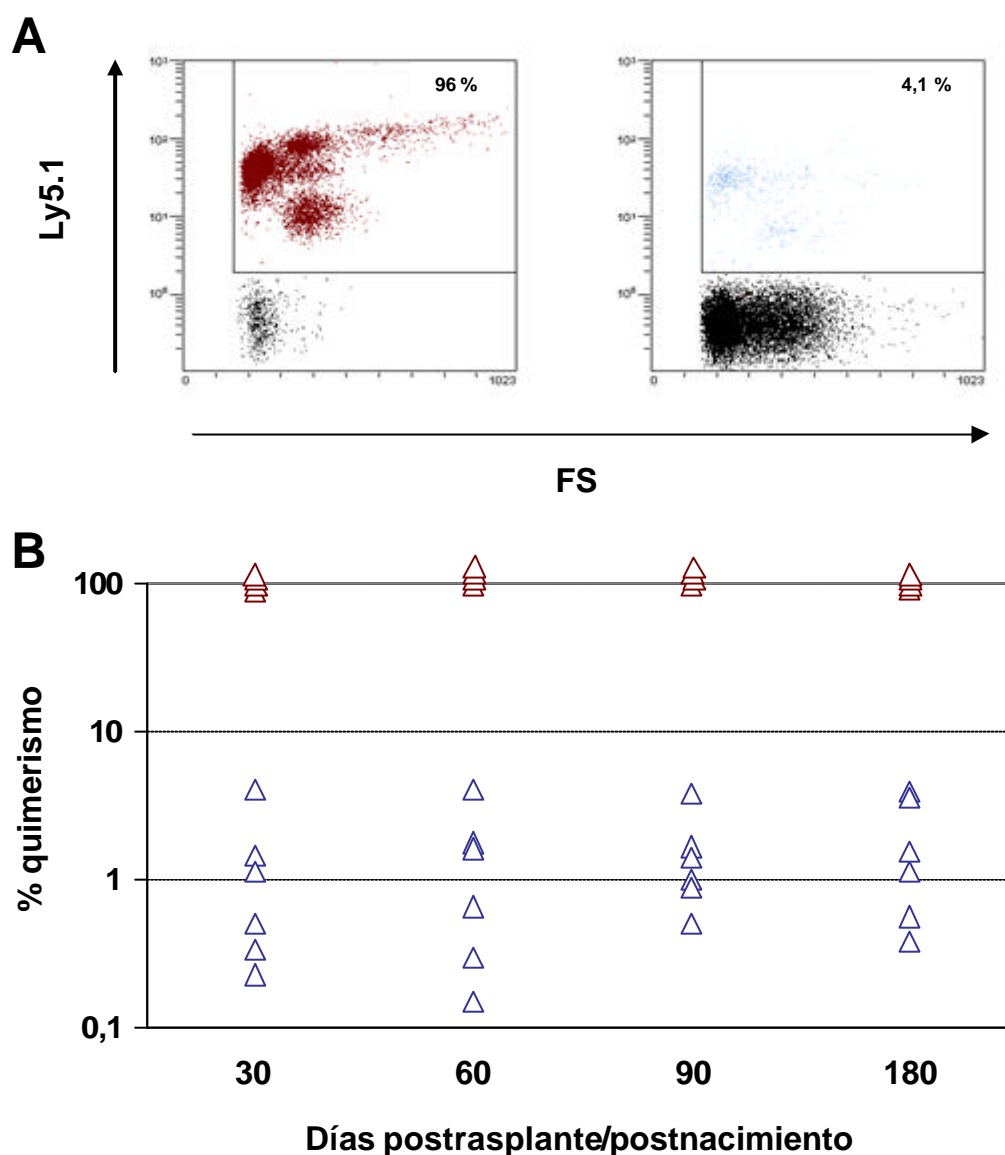


Figura 11. Quimerismo obtenido con células de hígado fetal no transducidas

A) Análisis por citometría de flujo de sangre periférica de un ratón adulto trasplantado (izquierda) y de un ratón trasplantado *in utero* (derecha) con células Lin⁻ de hígado fetal. En ambos casos se representa el porcentaje de injerto como % células Ly5.1 presentes en el receptor. **B)** Cinética de injerto de células del donante en ratones adultos trasplantados (triángulos rojos) y en ratones trasplantados *in utero* (triángulos azules), durante los 6 meses siguientes al trasplante y al nacimiento, respectivamente.

2.1. TRASPLANTE *IN UTERO* DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE HÍGADO FETAL UTILIZANDO PROTOCOLOS ESTÁNDAR DE TRANSDUCCIÓN *IN VITRO*

Para la puesta a punto del modelo en ratón de trasplante prenatal de células hematopoyéticas de hígado fetal singénicas expresando genes de interés se realizó una primera aproximación utilizando dos vectores de transferencia diferentes, uno retroviral y otro lentiviral, expresando EGFP como proteína marcadora. Se siguieron protocolos estándar de infección con ambos tipos de vectores que ya habían sido utilizados en nuestro laboratorio (Figura 9, materiales y métodos).

Para evaluar el porcentaje de progenitores hematopoyéticos de hígado fetal que habían sido transducidos en cada uno de los protocolos, se realizaron cultivos en medio semisólido. Transcurridos 7 días se efectuó el recuento de colonias totales y colonias que expresaban la proteína marcadora EGFP en cada uno de los experimentos. Ambos vectores utilizados permitieron la transducción de alrededor del 50% de los progenitores capaces de generar CFU-GMs (figura 12).

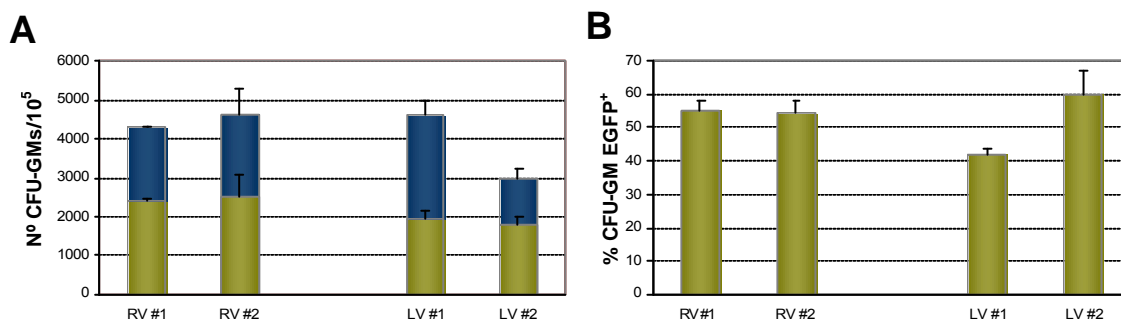


Figura 12. Contenido en precursores comprometidos, CFU-GMs, en células transducidas en condiciones estándar. A) Nº de colonias granulomacrofágicas totales (barras azules) y EGFP⁺ (barras verdes) por cada 10⁵ células sembradas; **B)** Porcentaje de colonias granulomacrofágicas EGFP⁺.

El porcentaje de supervivencia de los fetos trasplantados con células que habían sido transducidas con vectores retrovirales fue de un 75%. En ninguno de ellos se pudo observar quimerismo con células del donante, lo que sugirió que el protocolo de transducción afectaba de alguna manera a la capacidad de injerto de las células

trasplantadas. En el caso de la transducción con vectores lentivirales, el porcentaje de supervivencia fue de un 73%, nacieron 19 ratones de los 26 trasplantados. Cuatro de éstos presentaron niveles de quimerismo que oscilaban entre un 0,1 y un 0,3%, tanto a corto como a largo plazo (Tabla V). A pesar de ello, el porcentaje de ratones injertados era muy inferior al conseguido en ratones trasplantados con células de hígado fetal sin translucir (ver página 73), por lo que la capacidad de injerto de las células transducidas también podría verse afectada por el protocolo.

En ninguno de los ratones analizados pudieron observarse células expresando EGFP, a pesar de los elevados niveles de transducción obtenidos en los cultivos semisólidos.

Tabla V. Experimentos de trasplante singénico *in utero* de células transducidas *in vitro* con vectores virales utilizando protocolos estándar.

	Nº NACIDOS (Nº TRASPLANTADOS)	% SUPERVIVENCIA	% INJERTADOS (Nº INJERTADOS)	% QUIMERISMO (rango)
no manipuladas	7 (18)	39	86 (6)	1,22 (0,51 - 3,83)
RV #1	6 (9)	67	0 (0)	-
RV #2	9 (11)	82	0 (0)	-
LV #1	7 (8)	88	43 (3)	0,15 (0,1 - 0,15)
LV #2	12 (18)	67	8 (1)	0,16

Los porcentajes de quimerismo incluídos corresponden a 90 días después del nacimiento. Entre paréntesis se muestra el rango de quimerismo obtenido en cada experimento.

2.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRANSDUCCIÓN DE LAS CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE HÍGADO FETAL CON VECTORES LENTIVIRALES

Para establecer un protocolo de transducción *in vitro* que permitiera conseguir niveles elevados de quimerismo y de expresión del transgén, se efectuaron ensayos utilizando diferentes tiempos de transducción, distintas MOIs y distintas combinaciones de citoquinas en placas pretratadas o no con retronectina.

Dado que los progenitores hematopoyéticos de hígado fetal se encuentran en un estadio altamente proliferativo, los protocolos de transducción se llevaron a cabo eliminando el periodo de pre-estimulación. Una vez concluida la fase de infección, las células se lavaron y mantuvieron en cultivo durante 7 días, con las mismas combinaciones de factores de crecimiento utilizados durante la transducción para evaluar el porcentaje de células EGFP⁺. Además, finalizada la fase de infección, se realizaron cultivos en medio semisólido para evaluar el contenido de progenitores comprometidos y el porcentaje de ellos que expresaba EGFP.

El número total de CFU-GMs se utilizó para evaluar posibles efectos tóxicos de los distintos protocolos de transducción. Los valores más elevados de CFU-GMs se obtuvieron cuando las infecciones se realizaron en placas pretratadas con retronectina. Además, cuando las células se transdujeron en presencia de mSCF, Flt3 y hTPO, se observó un número mayor de CFU-GMs, especialmente cuando los periodos de transducción eran más largos (Figura 13A).

Los mejores porcentajes de transducción se obtuvieron tras un protocolo de 6 horas de infección. Tiempos más largos de transducción afectaron sensiblemente a la viabilidad de los progenitores (no mostrado). La presencia de mSCF, Flt3 y hTPO en el medio de cultivo durante el periodo de infección, junto con la utilización de placas pretratadas con retronectina, supuso un aumento significativo del porcentaje de células que expresaban EGFP. Con estas condiciones óptimas de infección, se alcanzaron porcentajes de hasta el 63% de transducción en cultivo semisólido (Figura 13B) y de más del 75% en cultivo líquido 7 días después de la infección (Figura 13C).

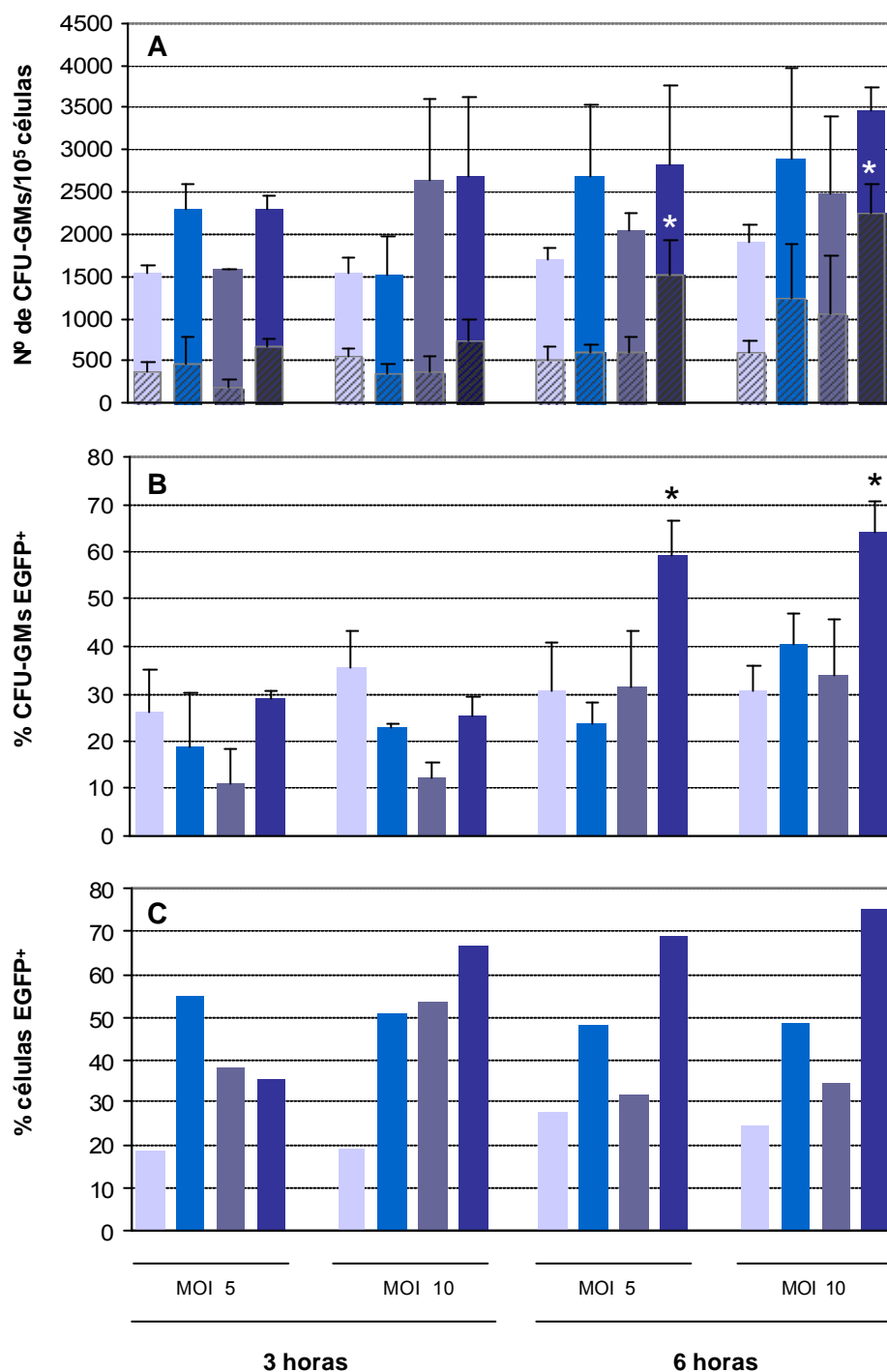


Figura 13. Influencia de las condiciones de transducción sobre la eficacia de transducción de progenitores de hígado fetal con vectores lentivirales. A) nº total de CFU-GMs (barras coloreadas) y nº de CFU -GMs EGFP⁺ (barras rayadas) obtenidas en cultivo semisólido por cada 10⁵ células sembradas; **B)** Porcentaje de CFU -GMs EGFP⁺ en cultivo semisólido; **C)** Porcentaje de células EGFP⁺ en cultivo líquido 7 días después de la infección. (■) hIL11 y mSCF, (■) hIL11 y mSCF en presencia de retronectina, (■) mSCF, hTPO y Flt3, (■) mSCF, hTPO y Flt3 en presencia de retronectina.

* Diferencias significativas con el resto de los grupos estudiados p<0, 05.

2.3. ESTUDIOS PRELIMINARES DE TRASPLANTE *IN UTERO* DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE HÍGADO FETAL TRANSDUCIDOS EN CONDICIONES DE MÍNIMA MANIPULACIÓN

En ensayos previos habíamos observado que el periodo de manipulación *in vitro* de las células de hígado fetal afectaba a su capacidad de injerto, por lo que, como primera aproximación, llevamos a cabo una serie de trasplantes de células transducidas en condiciones mínimas de manipulación. Realizamos un protocolo de 3 horas de infección con una MOI de 5, en presencia de mSCF y hIL11. En estos experimentos no se utilizó retronectina para pretratar las placas de cultivo, ya que en los estudios *in vitro* no se había observado mejoría notable ni en el número de progenitores capaces de generar colonias, ni en el porcentaje de células transducidas después de 3 horas de infección.

Se llevaron a cabo un total de 7 experimentos de trasplante *in utero* en los cuales se inyectaron 81 fetos. El porcentaje de supervivencia de estos animales (en torno a un 38% de media) fue muy similar al obtenido en animales trasplantados con progenitores de hígado fetal sin manipular (Tabla VI). En un 73% de los animales trasplantados se observó microquimerismo, pero ninguno de ellos presentó células que expresaran EGFP cuando se analizaron por citometría de flujo. El microquimerismo se observó estable tanto a corto (30 días post-nacimiento) como a largo plazo (180 días post-nacimiento) (Figura 14). Además, un análisis de diferentes tejidos hematopoyéticos, médula ósea y bazo, mostró la existencia de células del donante en todos ellos, así como en los distintos linajes hematopoyéticos analizados en sangre y médula ósea (Figura 15).

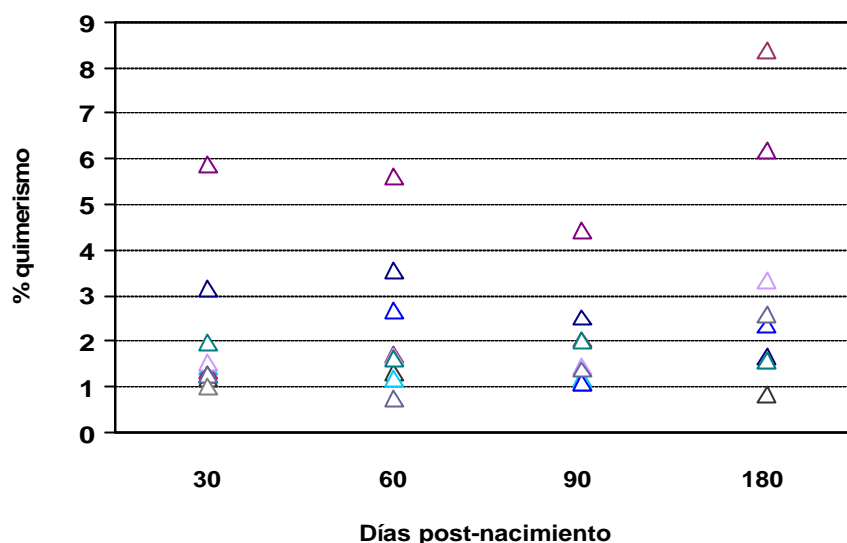


Figura 14. Cinética de injerto de células del donante en ratones trasplantados *in utero* en el día 14,5 de gestación. El porcentaje de quimerismo se determinó analizando el porcentaje de células Ly5.1⁺ en la sangre periférica del receptor. Cada color corresponde a un ratón.

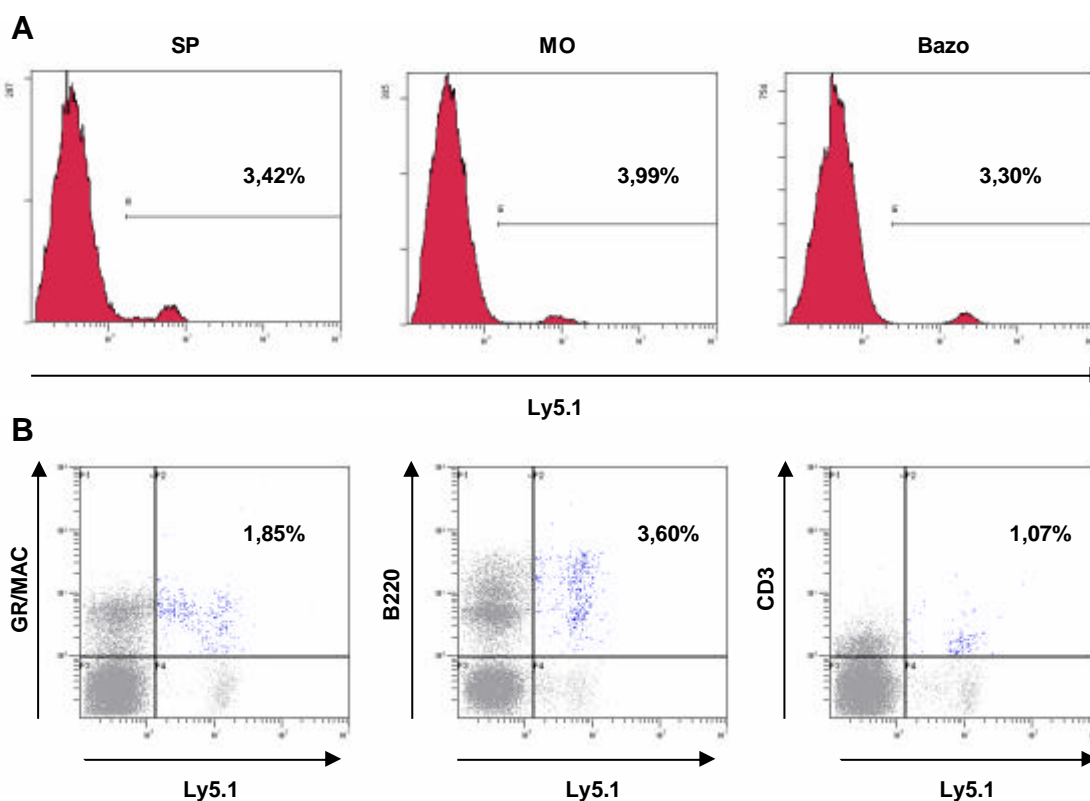


Figura 15. Análisis de injerto en ratones trasplantados *in utero* seis meses post-nacimiento. **A)** Porcentaje de injerto en diferentes órganos hematopoyéticos (sangre periférica, médula ósea y bazo); **B)** Porcentaje de injerto en los diferentes linajes hematopoyéticos (granulocitos y macrófagos [GR/MAC], linfocitos B [B220] y linfocitos T [CD3]). Se muestra el análisis de un animal representativo.

Tabla VI. Experimentos de trasplante singénico *in utero* de células transducidas con LV en condiciones mínimas de manipulación.

	Nº NACIDOS (Nº TRASPLANT.)	% SUPERVIV.	% INJERT. (Nº INJERT.)	% QUIMERISMO (rango)			
				30d	60d	90d	180d
no manipuladas	7 (18)	39	86 (6)	0,83 (0,23 - 4,05)	1,16 (0,1 - 4,03)	1,22 (0,51 - 3,83)	1,35 (0,38 - 3,92)
CM #1	0 (7)	0	-	-	-	-	-
CM #2	5 (17)	29	100 (5)	1,95 (1,27 - 5,85)	2,66 (0,75 - 5,71)	1,99 (1,12 - 4,43)	2,72 (1,1 - 6,19)
CM #3	6 (14)	43	100 (6)	1,25 (0,10 - 1,51)	1,30 (0,10 - 1,71)	1,13 (0,11 - 2,03)	1,13 (0,35 - 1,95)
CM #4	2 (3)	67	0 (0)	-	-	-	-
CM #5	0 (7)	0	-	-	-	-	-
CM #6	9 (18)	50	67 (6)	0,21 (0,14 - 0,65)	1,02 (0,10 - 4,23)	0,31 (0,17 - 0,71)	0,33 (0,14 - 0,57)
CM #7	9 (15)	50	100 (9)	0,17 (0,10 - 0,77)	0,95 (0,49 - 4,04)	0,25 (0,12 - 0,50)	0,29 (0,23 - 0,35)
TOTAL	31 (81)	38	73 (26)	-	-	-	-

En todos los casos se trasplantaron células Lin⁻ transducidas en presencia de mSCF y hIL11 con LV durante 3h, utilizando MOI 5 y en placas no pretratadas con retronectina. Entre paréntesis se muestra el rango de quimerismo obtenido en cada experimento.

Dado que en los diferentes tejidos hematopoyéticos analizados no se detectaron por citometría de flujo células del donante EGFP⁺, quisimos analizar la existencia de células que portaran el transgén en médula ósea y bazo por Q-PCR (Figura 16). Para ello se eligieron los 5 ratones que presentaron más injerto por citometría de flujo y se aisló el ADN genómico procedente de células de los tejidos citados. El número de copias por célula fue siempre inferior al 0,01%, salvo en uno de los ratones analizados en que alcanzó el 0,04% en médula ósea.

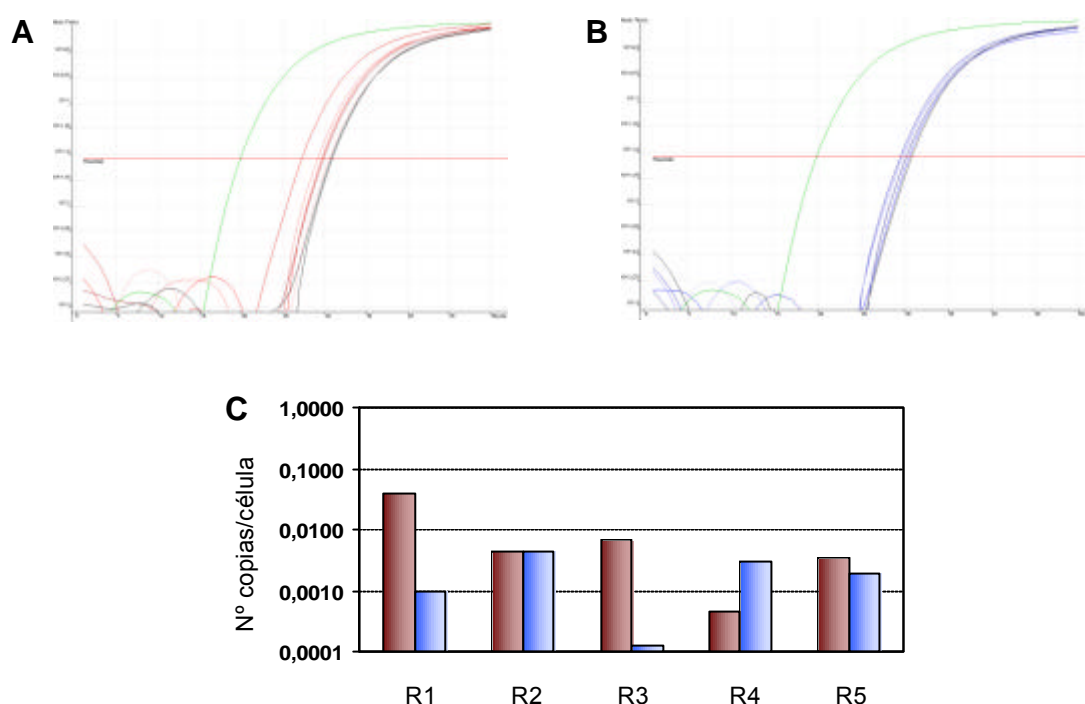


Figura 16. Análisis por Q-PCR del porcentaje de células transducidas procedentes del donante en animales transplantados *in utero* 6 meses después del nacimiento.

A) Diagrama correspondiente al ensayo realizado con ADN procedente de médula ósea.

B) Diagrama correspondiente al ensayo realizado con ADN procedente de bazo. La línea verde corresponde a la amplificación de una muestra co ntrol de ADN con más de 6 copi as por célula. La línea negra representa la amplificaci ón de un control negativo sin ADN viral integrado.

C) Representación del número de copias por célula. Las barras rojas corresponden a muestras de médula ósea y las azules a muestras de bazo.

Para comprobar la capacidad de reconstitución a más largo plazo de las células trasplantadas *in utero* se sacrificó un ratón que presentaba un porcentaje de injerto elevado 6 meses post -nacimiento. Se obtuvieron las células de la médula y se trasplantaron en 2 ratones adultos irradiados letalmente (5×10^6 células por animal). En la figura 17 se puede observar que las células que injertaron en los receptores primarios también lo hicieron en los secundarios, manteniéndose o aumentando ligeramente el porcentaje original de quimerismo obtenido en los receptores primarios hasta los 3 meses postrasplante.

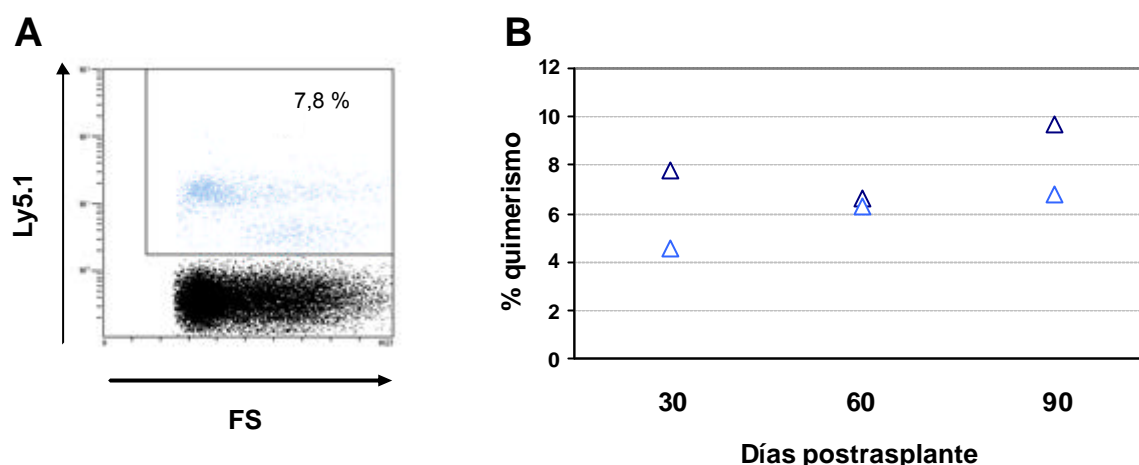


Figura 17. Análisis de quimerismo en receptores secundarios trasplantados con células de médula ósea de ratones trasplantados *in utero*. **A)** Análisis por citometría de flujo del porcentaje de injerto (% de células Ly 5.1⁺) en sangre periférica de un ratón trasplantado. **B)** Cinética de injerto de células del donante (Ly5.1⁺) en receptores secundarios durante los 3 meses siguientes al trasplante.

Con esta serie de experimentos pudimos concluir que con tiempos cortos de infección, los progenitores de hígado fetal mantenían su capacidad de injerto en ratones adultos irradiados y en fetos trasplantados en el día 14 de gestación, tanto a corto como a largo plazo. Pero con este protocolo no era posible obtener niveles de transducción suficientes como para detectar expresión del gen marcador en los animales injertados. Por este motivo la siguiente aproximación se realizó utilizando protocolos de infección optimizados según los ensayos realizados *in vitro*.

2.4. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE HÍGADO FETAL TRANSDUCIDOS EN CONDICIONES OPTIMIZADAS

Siguiendo los resultados obtenidos y presentados en la figura 13, se decidió evaluar la capacidad de injerto de los progenitores de hígado fetal transducidos durante 6 horas y utilizando una MOI 10 en ratones adultos letalmente irradiados, ya que en estas condiciones se obtuvieron los porcentajes más altos de transducción. Se establecieron 3 grupos de trasplante correspondientes a las condiciones de transducción utilizadas: grupo 1, mSCF y hIL11; grupo 2, mSCF, Flt3 y hTPO; grupo 3, mSCF, Flt3 y hTPO en placas pretratadas con retronectina. Finalizado el periodo de

infección, se realizaron cultivos semisólidos y se trasplantaron 5-6 ratones adultos letalmente irradiados por grupo.

En estas condiciones, los porcentajes de transducción de CFU⁺-GMs llegaron al 80% cuando se utilizaron placas pretratadas con retronectina y estimulación con mSCF, Flt3 y hTPO (figura 18).

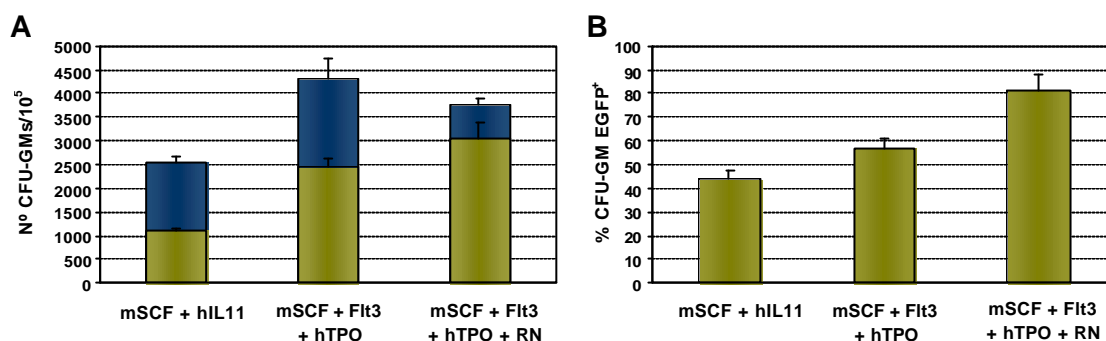


Figura 18. Contenido y porcentaje de transducción de precursores comprometidos, CFU-GMs, en condiciones optimizadas. A) Nº de CFU⁺-GMs (barras azules) y EGFP⁺ (barras verdes); **B)** Porcentaje de CFU-GMs EGFP⁺.

Todos los animales trasplantados presentaron reconstitución hematopoyética completa a partir de las células de hígado fetal, que se mantuvo hasta el momento del sacrificio de los animales, 90 días después del trasplante. En la figura 19, se pueden observar los porcentajes de células del donante expresando EGFP en los ratones de los diferentes grupos a los 30, 60 y 90 días postrasplante. En el primer grupo de ratones se observaron porcentajes de transducción en torno al 12% hasta los 90 días postrasplante. En el segundo grupo, los porcentajes de células EGFP⁺ fueron algo más elevados, en torno a un 15% de media. Los mayores porcentajes de células EGFP⁺ se obtuvieron de nuevo en los ratones del tercer grupo, superando el 30% de las células injertadas tanto a corto como a largo plazo.

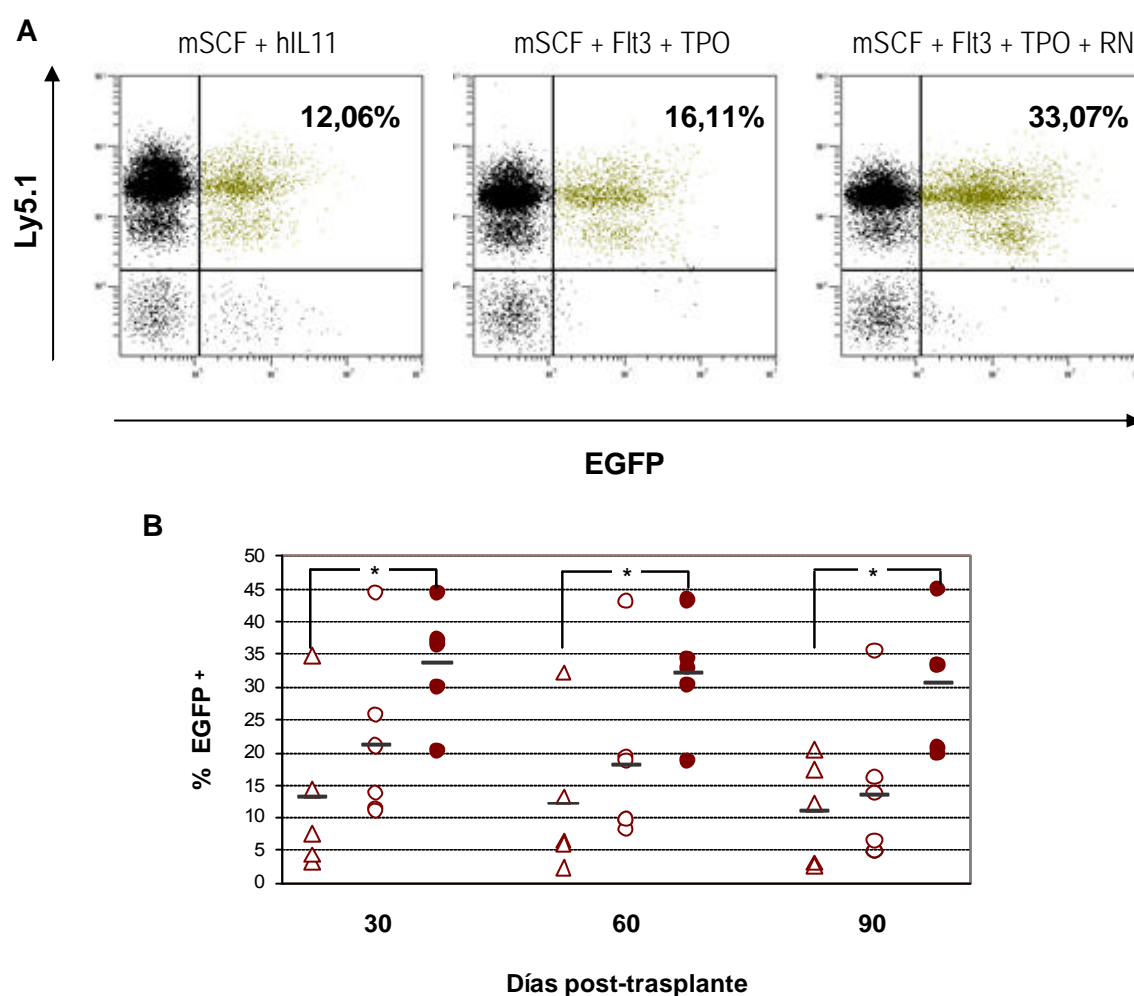


Figura 19. Análisis de quimerismo en ratones adultos trasplantados con progenitores de hígado fetal transducidos en condiciones optimizadas. A) Análisis por citometría de flujo de la sangre periférica de tres ratones representativos trasplantados con células Lin⁻ de hígado fetal transducidas durante 6h MOI10. En la parte superior del diagrama se indican las condiciones de cultivo utilizadas durante la transducción. El porcentaje de injerto se representa como porcentaje células Ly5.1 presentes en el receptor. **B)** Cinética de injerto de células del donante que expresan EGFP en ratones adultos trasplantados durante los 6 meses siguientes al trasplante. Combinaciones de factores: hIL11 + mSCF (Δ); mSCF+ hTPO + Flt3 (\circ); mSCF+ hTPO + Flt3 + RN (\bullet). Cada símbolo representa a un ratón. Las líneas corresponden al valor de la mediana de cada uno de los grupos experimentales. * p < 0,05.

A día 90 postrasplante se sacrificaron los ratones y se analizó el porcentaje de células hematopoyéticas procedentes del donante (Ly5.1), y el porcentaje de éstas que expresaban el transgén en sangre periférica, médula ósea y bazo mediante

citometría de flujo (figura 20). Todos los animales presentaron un porcentaje de células Ly5.1⁺ superior al 80% en los tejidos analizados. También se observaron porcentajes de células EGFP⁺ semejantes en todos los tejidos y entre animales del mismo grupo. Los animales del grupo 3 fueron los que mostraron niveles más elevados de células EGFP⁺, en torno a un 30% en los 3 tejidos.

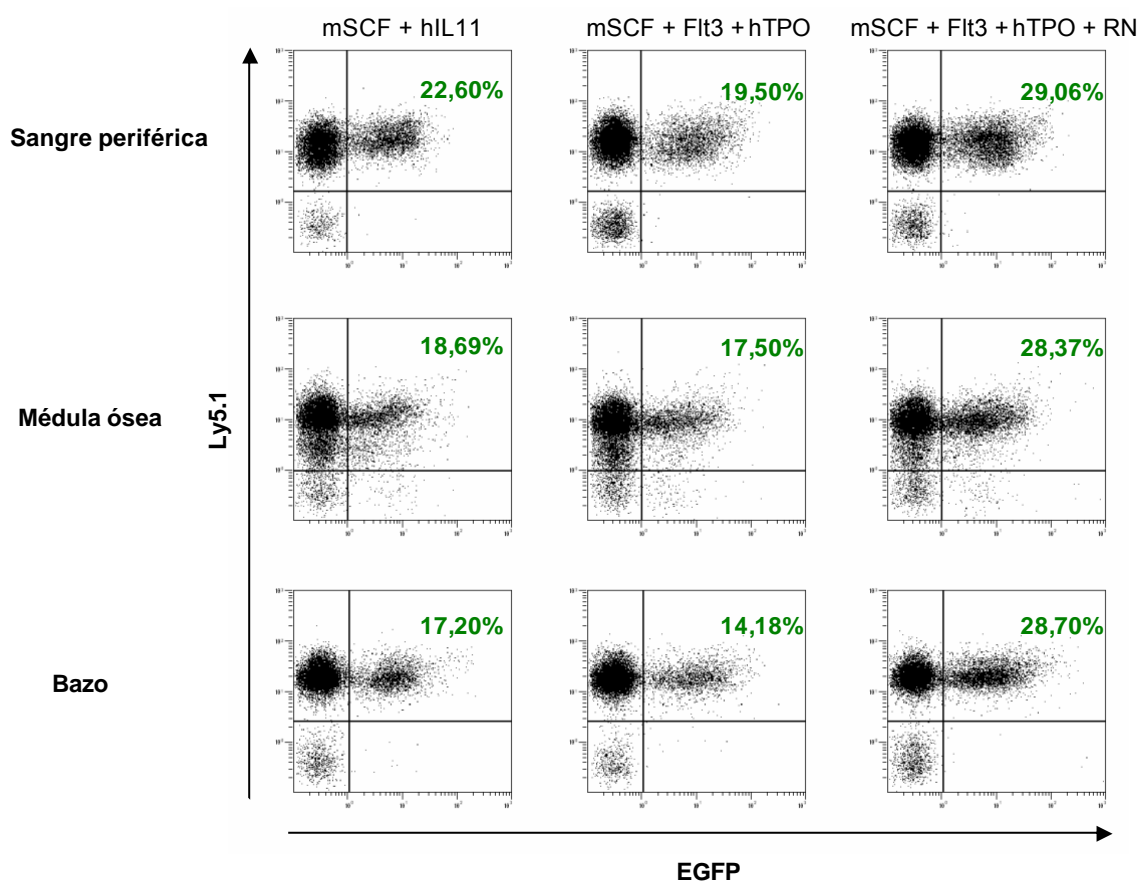


Figura 20. Quimerismo y porcentaje de células EGFP⁺ en distintos tejidos hematopoyéticos (sangre periférica, médula ósea y bazo) evaluado en los diferentes grupos de ratones trasplantados con células de hígado fetal transducidas en **condiciones optimizadas**. Las imágenes corresponden a un ratón representativo de cada grupo experimental. Los números en verde representan el porcentaje de células dobles positivas de cada una de las poblaciones estudiadas.

Una vez comprobada la capacidad de las células de hígado fetal de injertar en diferentes tejidos hematopoyéticos, quisimos determinar la capacidad de las mismas para diferenciar a los distintos linajes hematopoyéticos. En la figura 21 se puede ver como las células injertadas generaron todos los linajes hematopoyéticos del receptor y que existían células expresando el transgén en cada uno de los compartimentos analizados. Los ratones de los grupos 1 y 2 presentaron porcentajes de células EGFP⁺ semejantes en los diferentes linajes: linfoide T (CD3), linfoide B (B220) y mieloide (GR/MAC). Los animales del grupo 3 presentaron, en cada linaje, porcentajes de células expresando el transgen más elevados que los ratones de los otros 2 grupos, lo que correlaciona con los datos de transducción observados *in vitro* e *in vivo* a diferentes tiempos y en diferentes tejidos.

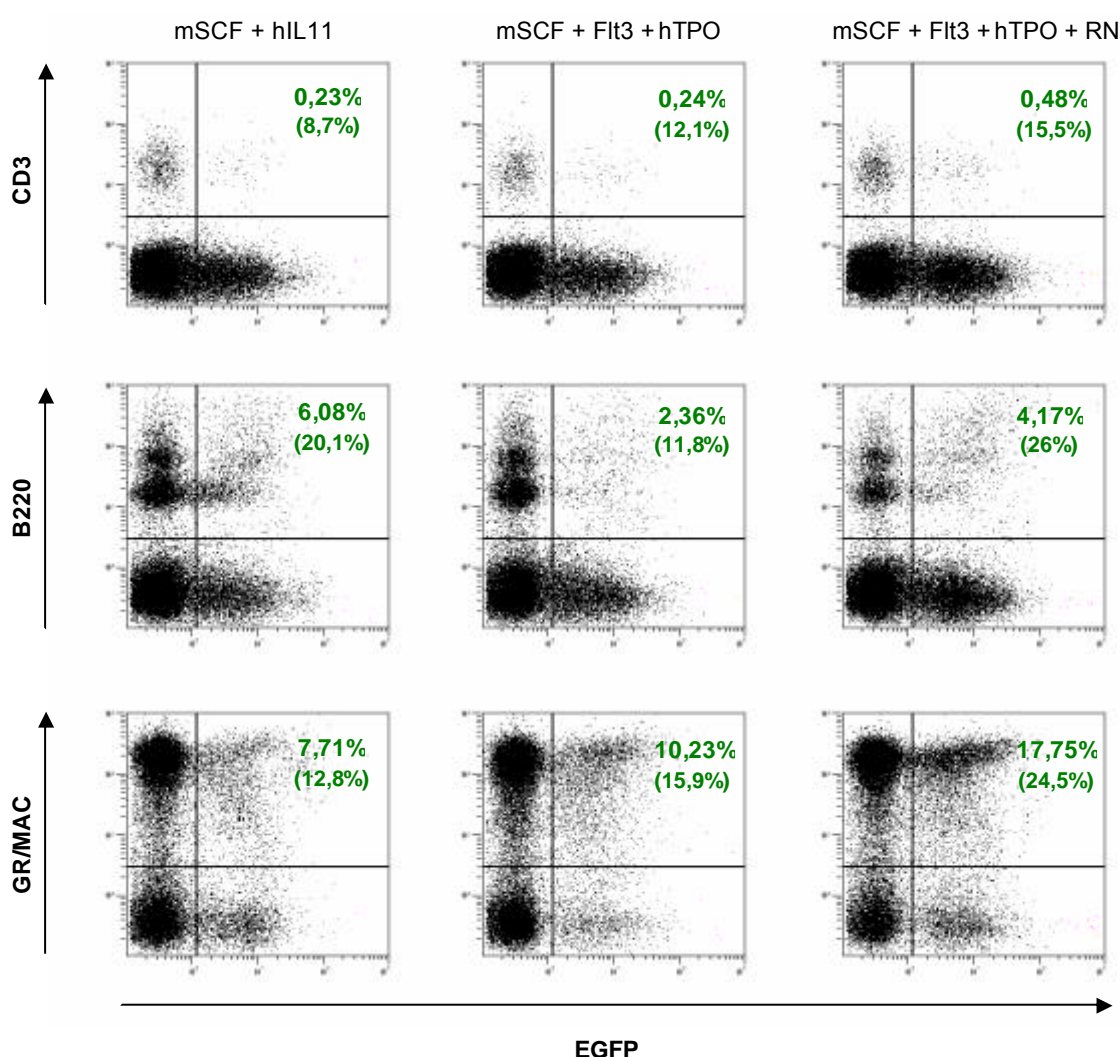


Figura 21. Distribución de las diferentes subpoblaciones hematopoyéticas en los diferentes grupos de ratones trasplantados con células de hígado fetal transducidas en condiciones optimizadas. Las imágenes corresponden a un ratón representativo de cada grupo experimental. Los números en verde representan el porcentaje de células dobles positivas de cada una de las poblaciones estudiadas. Los porcentajes indicados entre paréntesis corresponden a las células EGFP⁺ dentro de la población CD3⁺, B220⁺ o GR/MAC⁺.

Para evaluar la capacidad de injerto a muy largo plazo de las células hematopoyéticas procedentes de hígado fetal, se trasplantaron 5×10^6 células de la médula de 2 ratones de cada grupo, en 4 receptores secundarios letalmente irradiados por grupo. En los análisis realizados 30 y 60 días postrasplante, se pudo observar una reconstitución completa de los ratones trasplantados de los tres grupos. Analizando la sangre periférica de estos ratones se observaron porcentajes de células EGFP⁺

ligeramente incrementados con respecto a los que presentaban los ratones donantes, y sostenidos a lo largo del tiempo (figura 22).

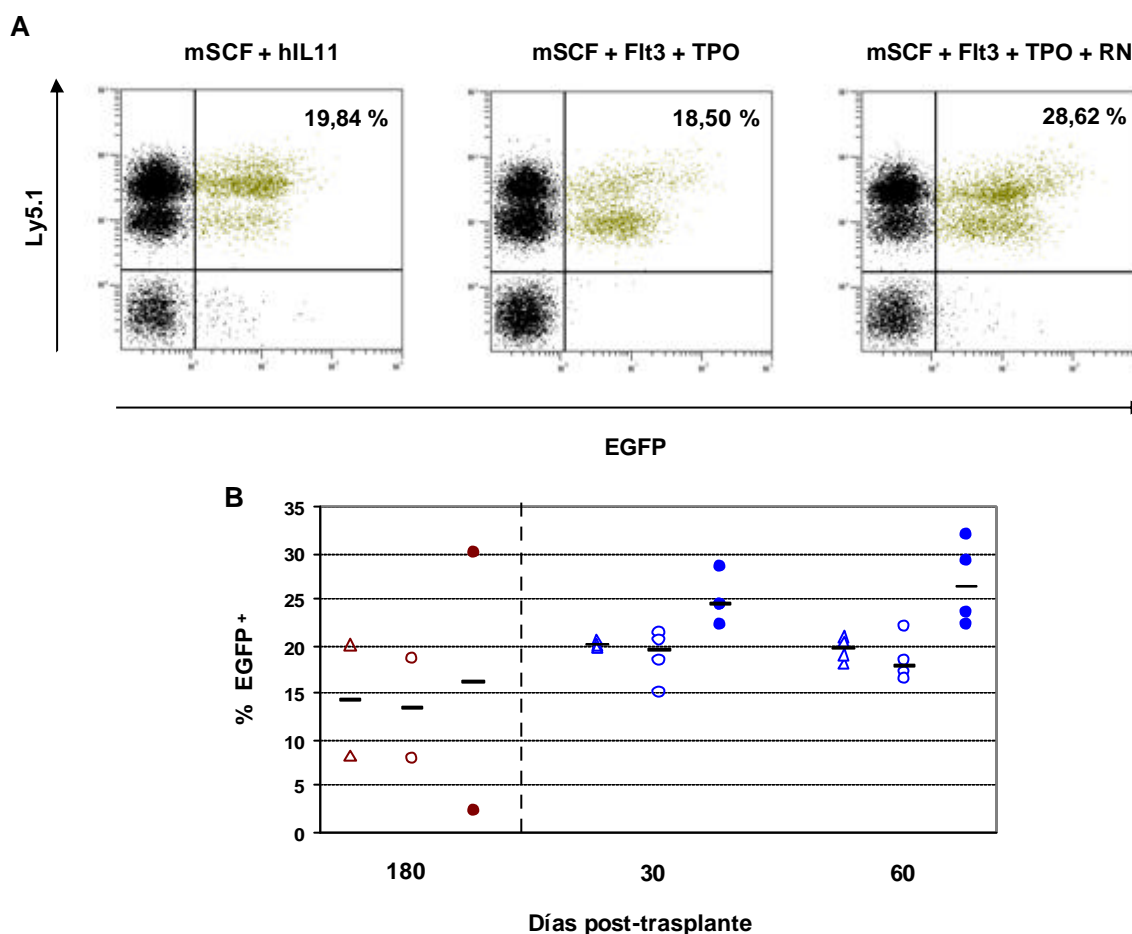


Figura 22. Análisis de quimerismo en ratones secundarios. A) Análisis por citometría de flujo del porcentaje de injerto (% de células Ly 5.1⁺) y del porcentaje de células transducidas en sangre periférica de un ratón trasplantado. **B)** Cinética de injerto de células del donante EGFP⁺ en ratones receptores secundarios durante los 2 meses siguientes al trasplante. hIL11 + mSCF (Δ); mSCF + hTPO + Flt3 (\circ); mSCF + hTPO + Flt3 + RN (\bullet). Cada símbolo representa a un ratón. Las líneas corresponden al valor de la mediana de cada uno de los grupos experimentales.

Una vez comprobada la capacidad de las células Lin⁻ de hígado fetal transducidas en condiciones optimizadas para injertar ratones adultos irradiados, estudiamos la capacidad de estas células de injertar en ratones trasplantados *in utero*. Se establecieron dos grupos experimentales en función de las condiciones de transducción: el primer grupo se infectó durante 6 horas y utilizando una MOI de 10 en presencia de mSFC y hIL11, combinación estándar en nuestro laboratorio para el

cultivo de progenitores hematopoyéticos de ratón; el segundo grupo se infectó durante el mismo tiempo, usando la misma MOI y en presencia de mSCF, Flt3 y hTPO en placas pretratadas con retronectina, combinación optimizada según los datos obtenidos en los ensayos *in vitro*.

Los porcentajes de transducción de colonias granulomacrofágicas se pueden observar en la figura 23. Aunque el porcentaje de colonias que expresaban EGFP varió entre experimentos, en los experimentos englobados en el segundo grupo se observó un porcentaje medio de transducción 3 veces más alto que en el primer grupo.

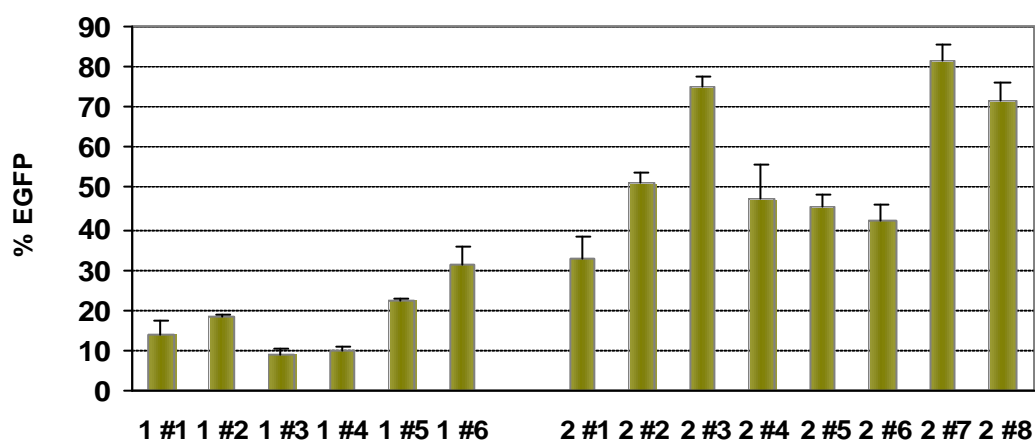


Figura 23. Porcentaje de CFU-GMs que expresan EGFP⁺ tras transducción con LV en distintas condiciones experimentales. Cada barra corresponde a un experimento independiente. Los 6 primeros experimentos corresponden a células Lin⁻ de hígado fetal transducidas en presencia de mSCF y hIL11, el resto corresponden a células Lin⁻ de hígado fetal transducidas en presencia de mSCF, Flt3 y hTPO en placas pretratadas con retronectina.

El primer grupo experimental englobó un total de 6 experimentos de trasplante *in utero*, uno de los cuales no llegó a término porque la madre sufrió un aborto. En el segundo grupo experimental se llevaron a cabo 8 experimentos. En dos de ellos las madres abortaron. Descartando los experimentos que finalizaron por aborto de todos los fetos, el porcentaje de ratones nacidos fue de un 45% en el primer grupo de experimentos y de un 77% en el segundo.

El porcentaje de quimerismo se analizó a 30, 60 y 90 días postnacimiento observando, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células que expresaban

Ly5.1. El porcentaje promedio de ratones injertados en el grupo 1 fue de un 68% y descendió al 34% en el grupo 2. Asimismo, los porcentajes de quimerismo alcanzados en el primer grupo experimental fueron significativamente más elevados que los alcanzados en el segundo, lo que podría indicar que la utilización de mSCF y hIL11 afecta en menor medida a la capacidad de injerto de los progenitores hematopoyéticos de hígado fetal transducidos.

Paradójicamente, el porcentaje de animales que presentaban células del donante expresando EGFP fue semejante en los dos grupos. En el primer grupo experimental (mSCF + hIL11) 3 animales de los 17 injertados expresaron EGFP (18%), en el segundo grupo experimental (mSCF + Flt3 + hTPO + RN) la expresaron 4 ratones de los 19 injertados (21%). En el segundo grupo, el porcentaje de células injertadas EGFP⁺ fue mucho más elevado que en el primero, superando en los 4 ratones que expresaban el transgen el 10% de las células procedentes del donante, y alcanzando el 60% en uno de los ratones quiméricos (figura 24, tabla VII).

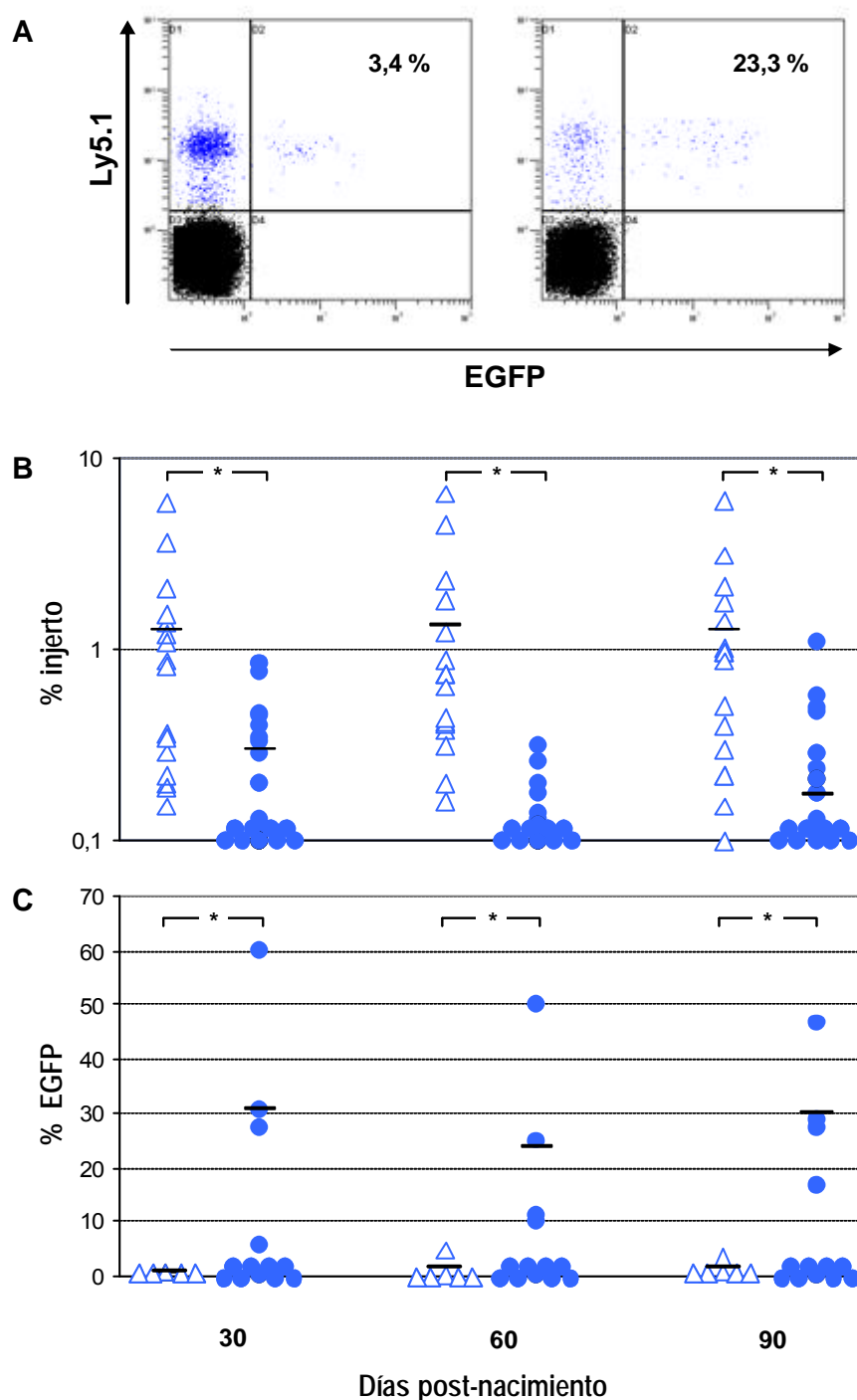


Figura 24. Quimerismo en ratones trasplantados *in utero*. **A)** Análisis por citometría de flujo del porcentaje de injerto de 2 ratones trasplantados *in utero*. El diagrama de la izquierda representa a un ratón trasplantado con células transducidas en presencia de mSCF y hIL11 y el diagrama de la derecha a un ratón trasplantado con células transducidas en presencia de mSCF, Flt3 y hTPO en placas pretratadas con RN; **B)** Cinética de injerto de células del donante (Ly5.1⁺). **C)** Cinética de injerto de células del donante que expresan EGFP. hIL11 + mSCF (Δ); mSCF + hTPO + Flt3 + RN (\bullet). Cada símbolo representa a un ratón. Las líneas corresponden al valor de la mediana de cada uno de los grupos experimentales.

* $p < 0,05$.

Para determinar la capacidad de injerto a largo plazo de las células de hígado fetal transducidas durante 6 horas y utilizando MOI 10 en diferentes tejidos hematopoyéticos, se analizó el porcentaje de células Ly5.1 en sangre periférica, médula ósea y bazo, a las 180 días postrasplante en los ratones del primer grupo experimental. En todos los animales se pudo detectar un quimerismo semejante en los tres tejidos analizados (figura 25A).

Además se pudo determinar que los progenitores transducidos en las condiciones descritas en el párrafo anterior y trasplantados *in utero* eran capaces de generar a largo plazo (180 días postrasplante) los diferentes linajes hematopoyéticos (figura 25B).

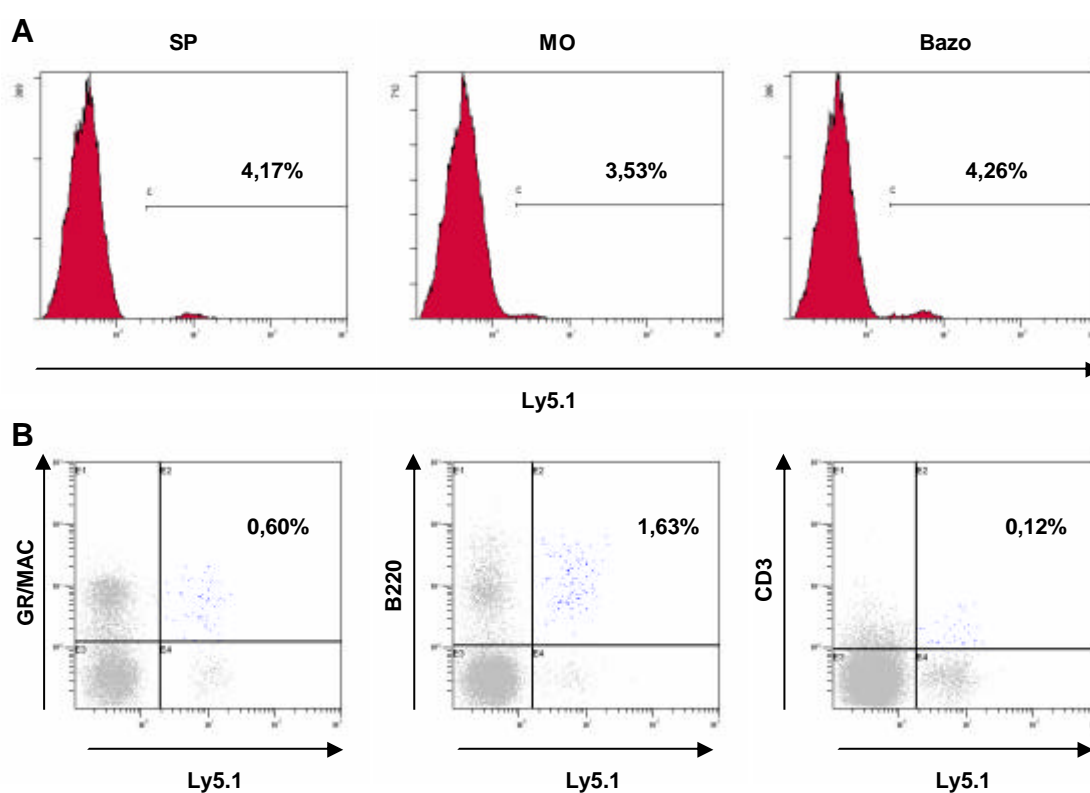


Figura 25. Análisis de injerto en ratones trasplantados *in utero* seis meses post-nacimiento. A) Porcentaje de injerto en diferentes órganos hematopoyéticos (sangre periférica, médula ósea y bazo); **B)** Porcentaje de injerto en los diferentes linajes hematopoyéticos (granulocitos y macrófagos [GR/MAC], linfocitos B [B220] y linfocitos T [CD3]). Se muestra el análisis de un animal representativo.

Para comprobar la capacidad de reconstitución a más largo plazo de las células trasplantadas *in utero*, se sacrificaron a los 6 meses de edad los tres ratones con mayor porcentaje de injerto del primer protocolo experimental, y se trasplantaron 5×10^6 células de médula ósea de cada uno de los ratones en dos receptores secundarios letalmente irradiados. En la figura 26 se puede observar que las células que injertaron en los receptores primarios también lo hicieron en los secundarios, manteniéndose o aumentando ligeramente el porcentaje original de quimerismo obtenido en los receptores primarios hasta los 3 meses postrasplante.

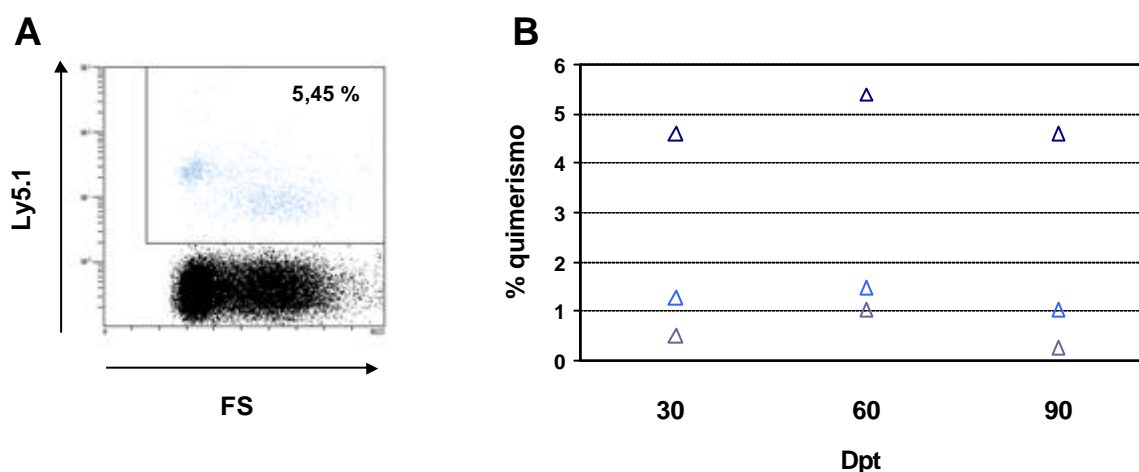


Figura 26. Análisis de quimerismo en receptores secundarios trasplantados con células de médula ósea de ratones trasplantados *in utero* en condiciones optimizadas (6h, MOI 10), en presencia de mSCF y hIL11. A) Análisis por citometría de flujo de 1 porcentaje de injerto (% de células Ly 5.1⁺) en sangre periférica de un ratón traspl antado. **B)** Cinética de injerto de células del donante (Ly5.1⁺) en ratones receptores secundarios durante los 3 meses siguientes al trasplante.

Tabla VII. Experimentos de trasplante singénico in utero de células transducidas con LV en condiciones optimizadas.

experimento	supervivencia		injerto		EGFP		quimerismo (rango)		
	nacidos/transplantados	% supervivencia	injertados vs nac.	% injert.	vs nacidos	EGFP+ vs injert.	% EGFP+	% 30d	% 60d
no manipuladas	7/18	39	6/7	86	-	-	0,83	1,16	1,22
							(0,23-4,05)	(0,1-4,03)	(0,51-3,83)
1 #1	6/9	67	6/6	100	3/6	50	1,37	1,23	1,38
							(0,29-5,87)	(0,2-6,49)	(0,22-5,96)
1 #2	7/16	44	0/7	0	0/0	0	= 0,1	= 0,1	= 0,1
1 #4	1/6	17	1/1	100	0/1	0	na	0,39	0,39
1 #5	8/13	62	7/8	88	0/7	0	1,08	0,69	0,96
							(0,2-2,07)	(0,15-2,3)	(0,1-2,1)
1 #6	3/8	38	3/3	100	0/3	0	0,19	0,31	0,40
							(0,15-0,22)	(0,16-0,44)	(0,15-0,5)
2 #1	6/10	60	0/10	0	0/0	0	= 0,1	= 0,1	= 0,1
2 #3	12/14	86	10/12	83	0/10	0	0,365	0,14	0,21
							(0,1-0,85)	(0,1-0,31)	(0,1-1,08)
2 #5	9/9	100	4/9	44	0/4	0	0,10	0,10	0,18
							(0,1-0,12)	(0,1-0,12)	(0,1-0,63)
2 #6	5/8	63	2/5	40	1/2	50	0,25	0,11	0,11
							(0,25-0,35)	(0,1-0,12)	(0,1-0,12)
2 #7	11/15	73	2/11	18	2/2	100	0,38	0,15	0,24
							(0,29-0,46)	(0,12-0,18)	(0,1-0,29)
2 #8	8/10	80	1/8	13	1/1	100	0,10	0,26	0,47

Se trasplantaron células Lin- transducidas con LV durante 6h y utilizando MOI 10 (1) en presencia de mSCF y hIL11 o (2) en presencia de mSCF, Flt3 y hTPO en placas pretratadas con RN.

2.5. ESTUDIOS DE RESPUESTA INMUNE EN RATONES TRASPLANTADOS *IN UTERO* CON CÉLULAS MARCADAS GENÉTICAMENTE

Como se ha comentado en el apartado anterior, a pesar de obtener porcentajes de células EGFP⁺ más altos en los ratones trasplantados con células transducidas en presencia de mSCF, Flt3, hTPO y retronectina, el porcentaje de ratones con células expresando el gen marcador fue similar en ambos grupos.

Para determinar si los ratones trasplantados *in utero* con poblaciones celulares que presentaban altos porcentajes de transducción habían desarrollado respuesta inmune contra la EGFP, se recogió el suero de todos los ratones supervivientes pertenecientes al segundo grupo experimental referido en el apartado 2.4 (transducción durante 6h MOI 10, en presencia de mSCF, Flt3, hTPO y retronectina) 5 meses después del nacimiento, y se evaluó la existencia de anticuerpos anti-EGFP mediante ELISA específico para esta proteína.

En la figura 27 se puede observar la existencia de respuesta humoral frente a EGFP (valores de densidad óptica (DO), medidos a 450 nm, superiores a 2) en 31 de los 51 ratones testados. Según los resultados de este ensayo se establecieron 4 grupos en función del injerto que presentaban los ratones y la detección de anticuerpos contra EGFP en los sueros procedentes de los mismos (figura 27; tabla VIII). En el grupo 1 (G1) se englobaron un total de ocho ratones que presentaron injerto estable tanto a corto como a largo plazo y anticuerpos anti-EGFP en suero. El grupo 2 (G2) lo formaron 23 ratones, 4 de ellos presentaron injerto a corto plazo pero lo perdieron rápidamente y 19 no mostraron injerto, con anticuerpos contra EGFP. En ninguno de los ratones incluidos en estos 2 primeros grupos se observó expresión del transgén. El grupo 3 (G3) lo formaron 10 ratones que no presentaron injerto ni respuesta humoral frente a EGFP. Finalmente, en el grupo 4 (G4) se englobaron los diez ratones restantes que no tenían anticuerpos anti-EGFP pero sí estaban injertados. Cuatro de los ratones pertenecientes a este último grupo (G4V) presentaron entre un 6 y un 60% de células del donante expresando el transgen (Figura 27; tabla VIII).

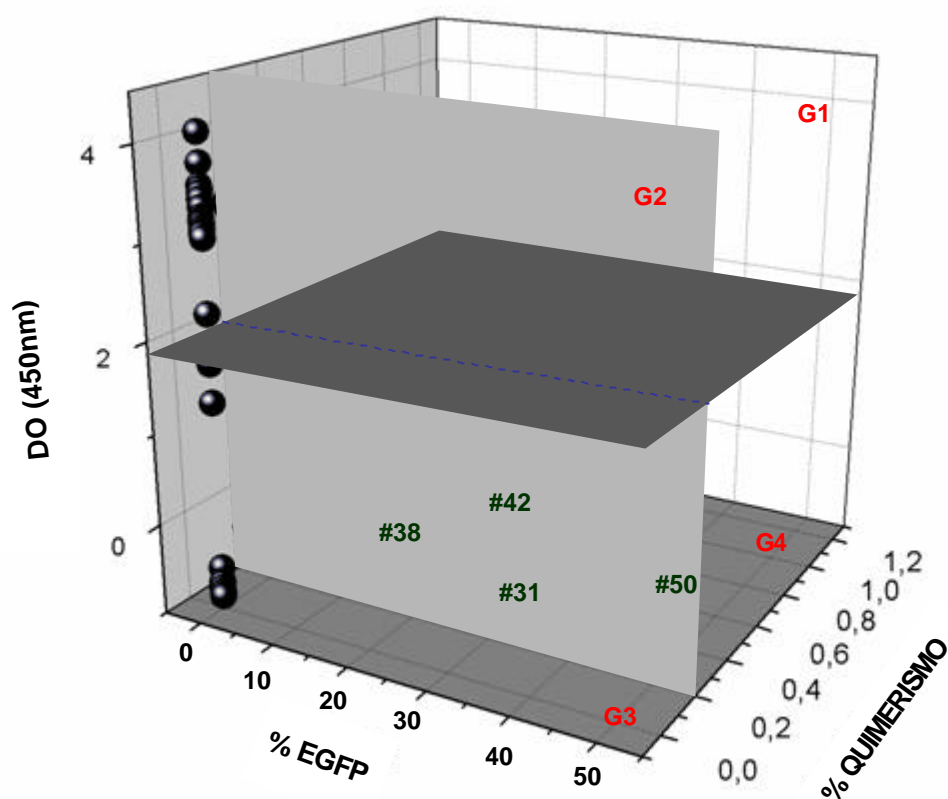


Figura 27. Determinación de anticuerpos anti-EGFP en ratones trasplantados *in utero*. Se obtuvo el suero de los ratones trasplantados con células transducidas durante 6h utilizando MOI10 y en presencia de mSCF, Flt3, hTPO y retronectina. A los 5 meses del nacimiento se determinó la existencia de respuesta humoral frente a EGFP mediante ELISA. En la figura se representa porcentaje de quimerismo en ratones trasplantados vs valores de densidad óptica obtenidos mediante ELISA vs porcentaje de células injertadas que expresan EGFP. Cada punto representa un ratón de los 51 analizados. Los números en verde señalan los ratones que presentaron células EGFP⁺. En rojo se representan los cuatro grupos establecidos en función del porcentaje de quimerismo y la presencia de anticuerpos anti-EGFP en suero.

Para determinar el tipo de respuesta humoral específica frente a EGFP en los ratones trasplantados *in utero* con células transducidas, se inyectaron 2 µg de EGFP recombinante en 9 de los ratones del segundo grupo experimental referido en el apartado 2.4 de este manuscrito, a los 180 días después del nacimiento. Cada 2 días y hasta el día 20 postinyección se procedió al sangrado de los animales y se obtuvo el suero, que se ensayó para la detección de IgGs e IgMs anti-EGFP.

Se observó una respuesta secundaria clara frente a EGFP en dos de los ratones (ratones 3 y 20) que en la primera aproximación habían presentado anticuerpos anti-EGFP pero no injerto (grupo 2). Ambos mostraron IgGs mantenidas durante los 20 días post-reinmunización y además en el segundo de ellos se detectaron IgMs a partir del día 6 post-reinmunización (figura 28, tabla VIII). En la figura 28 también se muestran los valores de IgMs e IgGs en suero de un ratón injertado con células que expresaban EGFP (ratón 50). En este ratón no se detectaron IgGs en suero pero sí una cantidad sostenida de IgMs desde el día 0, lo que indica que la nueva exposición al antígeno no generó respuesta alguna, sino que ya existían en sangre. El resto de los ratones no mostraron respuesta alguna a la inyección del antígeno.

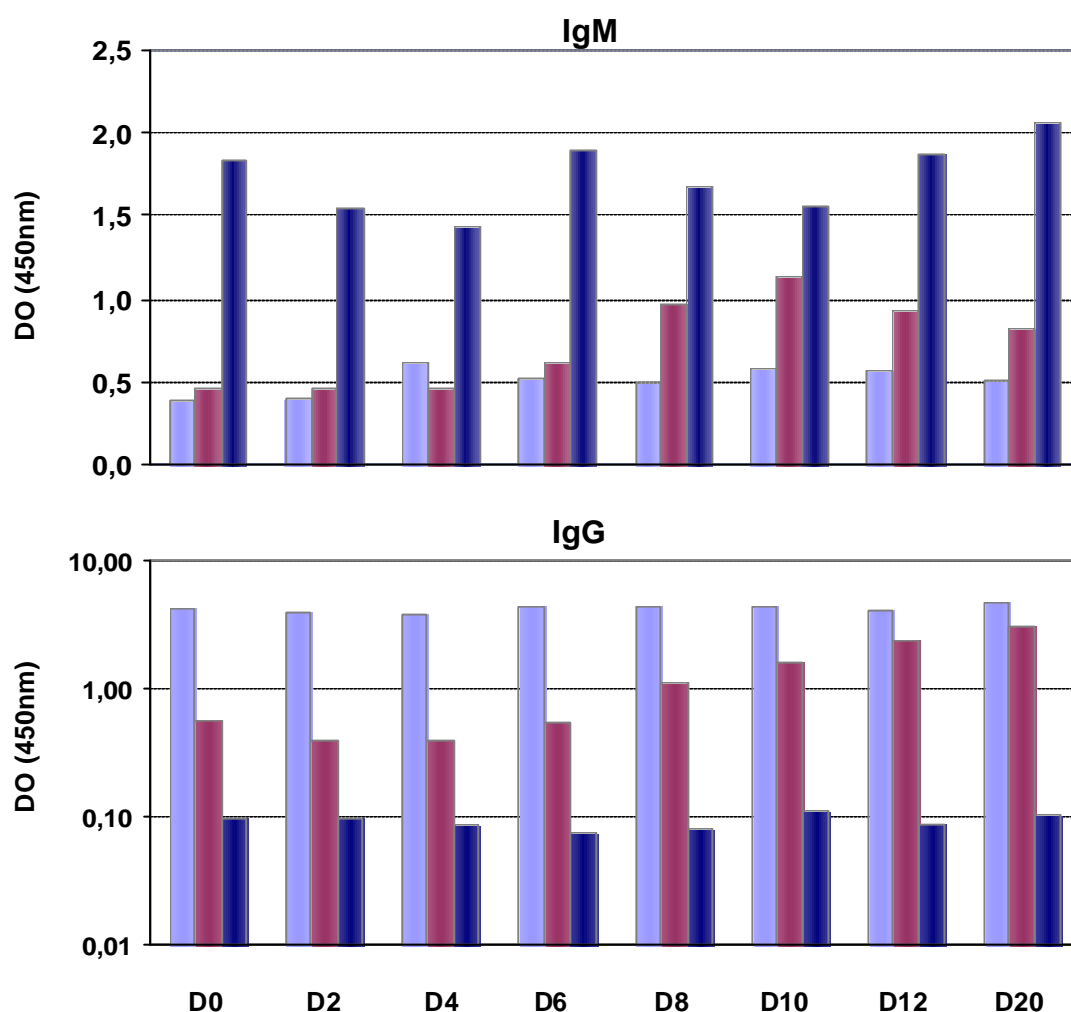


Figura 28. Determinación de IgM e IgG específicas para EGFP en ratones trasplantados *in utero* con células transducidas (6h, MOI10, mSCF, Flt3, hTPO y retronectina) y reinmunizados a diferentes tiempos postinyección. A) evaluación de IgMs en suero mediante ELISA; B) evaluación de IgGs en suero mediante ELISA. Cada barra representa un ratón. (■) ratón no injertado que muestra respuesta secundaria a EGFP; (■) ratón no injertado que muestra respuesta secundaria a EGFP; (■) ratón injertado con células que expresan EGFP que no muestra respuesta humoral específica frente al antígeno.

Dado que algunos de estos ratones presentaron una respuesta humoral clara frente a EGFP, nos planteamos estudiar la existencia de una respuesta celular asociada a la exposición a este antígeno. Para ello procedimos al sacrificio de 12 animales trasplantados *in utero*, pertenecientes al segundo grupo experimental citado en el apartado 2.4, 5 meses después del nacimiento. Se extrajeron los bazo y con los esplenocitos aislados se realizó un ensayo de proliferación frente a EGFP con timidina tritiada. Cuatro de los ratones mostraron respuesta celular (R17, R23, R6 y R1; ver figura 29A y tabla VIII), además de respuesta humoral en el primer ensayo. Los ratones 17 y 23 además presentaban quimerismo tanto a corto como a largo plazo.

Para valorar la secreción de INF γ por los esplenocitos en presencia de EGFP se recogieron 100 μ l de sobrenadante de los pocillos en los que se realizaron los ensayos de proliferación, tras 5 días de cultivo. Con estos sobrenadantes se realizó un ELISA con el que se pudo determinar que los esplenocitos de los ratones 17 y 6 secretaban valores detectables de INF γ (figura 29B).

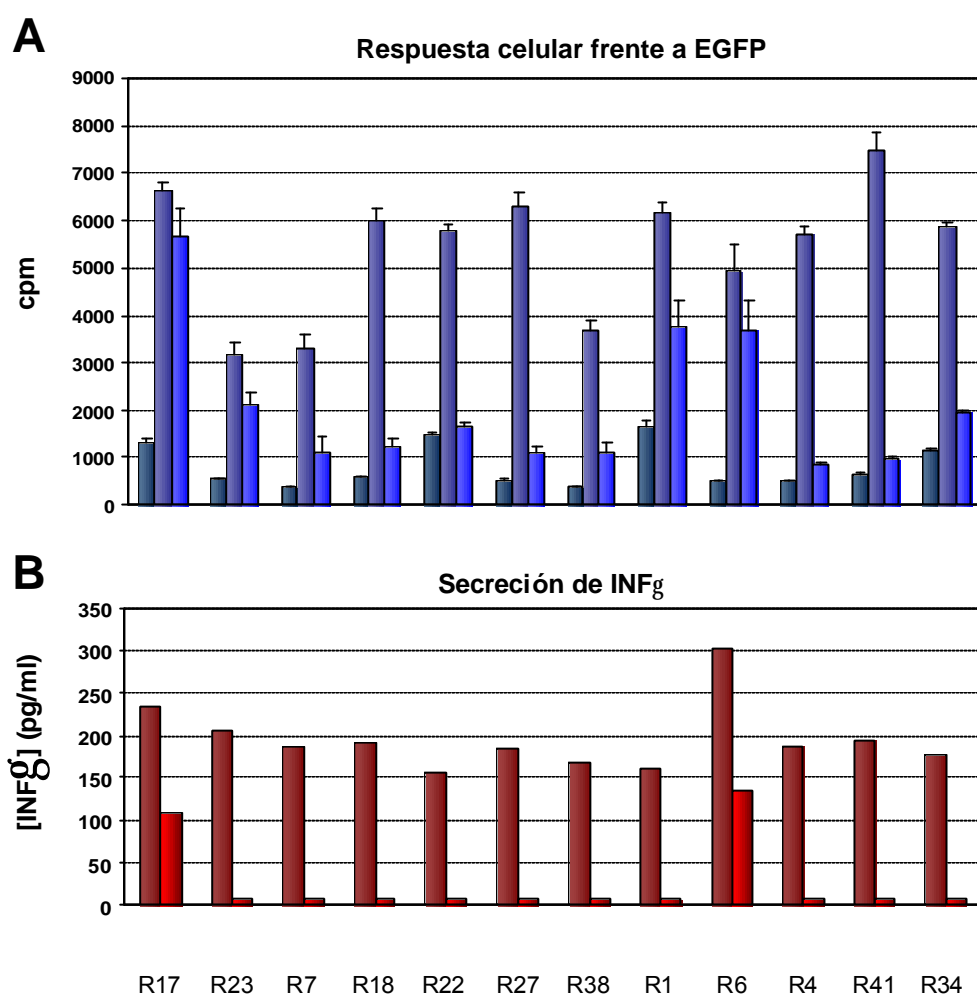


Figura 29. Respuesta celular a la estimulación *in vitro* con EGFP y secreción de INF_γ. 6 meses después del nacimiento se sacrificaron 12 ratones trasplantados *in utero* con células transducidas y se obtuvieron los esplenocitos que se cultivaron en presencia de 10 µg/ml de EGFP. **A)** Proliferación celular en respuesta a EGFP determinada mediante la incorporación de timidina tritiada. (■) Cultivo de esplenocitos solos; (■) Esplenocitos cultivados en presencia de PHA; (■) Esplenocitos cultivados en presencia de EGFP. **B)** Secreción de INF_γ. (■) Sobrenadantes procedentes del cultivo de esplenocitos en presencia de PHA; (■) Sobrenadantes procedentes del cultivo de esplenocitos en presencia de EGFP.

Tabla VII. Resumen de los diferentes ensayos de respuesta inmune realizados en ratones trasplantados *in utero*.

RATÓN	GRUPO	ANTICUERPOS	% QUIMERISMO			RESPUESTA CELULAR	IFN _g	RE-INMUNIZACIÓN	
		ANTI-EGFP*	30d	60d	90d			RESP. PRIMARIA	RESP. SECUNDARIA
7	G1	+	0,20	0,14	0,13	no	no		
8		+	0,45	0,31	0,10				
16		+	0,85	0,00	0,12				
17		+	0,10	0,00	0,49	si	si		
18		+	0,13	0,00	0,18	no	no		
23		+	0,10	0,10	0,57	si	no		
24		+	0,10	0,10	0,10			no	no
25		+	0,10	0,10	0,18				
12	G2	+	0,20	0,00	0,00				
13		+	0,40	0,20	0,00				
15		+	0,77	0,00	0,00				
28		+	0,10	0,00	0,00				
1		+	0,00	0,00	0,00	si	no		
2		+	0,00	0,00	0,00				
3		+	0,00	0,00	0,00			no	si
4		+	0,00	0,00	0,00	no	no		
5		+	0,00	0,00	0,00				
6		+	0,00	0,00	0,00	si	si		
10		+	0,00	0,00	0,00				
19		+	0,00	0,00	0,00				
20		+	0,00	0,00	0,00			no	si
21		+	0,00	0,00	0,00				
26		+	0,00	0,00	0,00				
29		+	0,00	0,00	0,00				
39		+	0,00	0,00	0,00				
40		+	0,00	0,00	0,00				
41		+	0,00	0,00	0,00	no	no		
45		+	0,00	0,00	0,00				
47		+	0,00	0,00	0,00				
48		+	0,00	0,00	0,00				
49		+	0,00	0,00	0,00				
32	G3	-	0,00	0,00	0,00				
33		-	0,00	0,00	0,00			retrasada	no
34		-	0,00	0,00	0,00	no	no		
35		-	0,00	0,00	0,00			no	no
36		-	0,00	0,00	0,00				
37		-	0,00	0,00	0,00				
43		+-	0,00	0,00	0,00				
44		-	0,00	0,00	0,00			no	no
46		-	0,00	0,00	0,00				
51		-	0,00	0,00	0,00				
9	G4	-	0,10	0,13	1,08				
11		-	0,84	0,00	0,24				
22		-	0,12	0,10	0,29	no	no		
27		-	0,10	0,12	0,11	no	no		
30		-	0,25	0,10	0,21			no	no
14		+-	0,33	0,00	0,00				
31	G4V	-	0,35	0,10	0,21			no	no
38		-	0,29	0,18	0,12	no	no		
42		-	0,46	0,12	0,29				
50		-	0,10	0,26	0,47			no	no

* - valores de DO <1; +- valores de DO comprendidos entre 1 y 2; - valores de DO ≥2.

3. TERAPIA PRENATAL EN MODELOS MURINOS DE ENFERMEDADES MONOGENICAS

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que los progenitores hematopoyéticos procedentes de médula ósea adulta son capaces de injertar en ratones trasplantados *in utero* y generar niveles de quimerismo compatibles con un potencial beneficio clínico para enfermedades genéticas de la hematopoyesis (Rio et al, 2005). Para estudiar si este injerto podría tener potencial terapéutico, se llevaron a cabo dos grupos de experimentos de trasplante *in utero* con células singénicas sanas procedentes de ratones sanos (terapia celular) o procedentes de ratones corregidas con un gen terapéutico (terapia génica *ex vivo*). Se eligió un modelo de ratón portador de una mutación hipomórfica en el gen *Brca2/FancD1* (gen implicado en la ruta de Fanconi y que se ve afectado en individuos que padecen Anemia de Fanconi, AF -D1) para aplicar terapia celular prenatal. Por otra parte se tomo un modelo de ratón deficiente en piruvato quinasa eritrocitaria para realizar un ensayo de terapia génica prenatal.

3.1.TERAPIA CELULAR EN UN MODELO DE RATÓN DE ANEMIA DE FANCONI (AF-D1)

La ventaja proliferativa de las células sanas trasplantadas en ratones adultos portadores de una mutación hipomórfica en el gen *Brca2/FancD1* no acondicionados (Navarro et al., 2006) o levemente acondicionados (Rio et al., 2008) ha sido demostrada previamente en nuestro laboratorio. Basándonos en estos resultados quisimos comprobar la existencia de esta ventaja proliferativa cuando las células eran trasplantadas *in utero*, ya que esto abriría una nueva posibilidad terapéutica para pacientes con anemia de Fanconi.

Se cruzaron ratones heterocigotos para la mutación en el gen *Brca2/FancD1* y se trasplantaron un total de 64 fetos con células procedentes de ratones Balb/c. 17 de los ratones trasplantados *in utero* llegaron a término (27% de supervivientes) (Tabla IX).

Tabla IX. Experimentos de trasplante *in utero* en ratones Brca2.

experimento	Nº NACIDOS (Nº TRASPLANTADOS)	% SUPERVIVENCIA	% KO (Nº KO)	% INJERTADOS (Nº INJERTADOS*)
Brca2 #1	2 (18)	11	50 (1)	100 (1)
Brca2 #2	3 (11)	27	0 (0)	0 (0)
Brca2 #3	2 (9)	22	0 (0)	100 (1)
Brca2 #4	1 (9)	11	100 (1)	100 (1)
Brca2 #5	9 (17)	53	0 (0)	100 (4)
TOTAL	17 (64)	27	11,8 (2)	100 (7)

* el número y el porcentaje de injertados se refiere a los ratones en los que se pudo analizar quimerismo.

Para determinar si los ratones trasplantados eran homocigotos o heterocigotos para la mutación, o no la portaban, se aislaron fibroblastos procedentes de oreja y se procedió a su genotipado mediante Q-PCR. Dos de los ratones supervivientes fueron homocigotos para la mutación (12%), diez fueron heterocigotos (59%) y 5 no presentaron la mutación en el gen *Brca2/FancD1* (29%) (Tabla X).

Todos los ratones utilizados como donantes fueron machos, de esta manera se podía detectar el porcentaje de quimerismo determinando la existencia del cromosoma Y en las hembras trasplantadas mediante Q-PCR. Nueve de los 17 ratones supervivientes fueron hembras. Se les extrajo sangre periférica a 30, 60 y 90 días post-nacimiento y se obtuvo el ADN. Las siete ratonas analizadas presentaron quimerismo estable. Una de las 2 hembras homocigotas para el gen *Brca2/FancD1* (h#1) presentó un porcentaje de injerto de un 16 % a los 30 días post -nacimiento que superó el 99% a los 60 días , demostrándose la ventaja de las células sanas cuando son trasplantadas *in utero*. El resto de las hembras presentaron porcentajes de quimerismo de entre un 1,5 y un 7,3%, con independencia de su genotipo.

Tabla X Genotipo y analisis de quimerismo en ratones trasplantados *in utero*.

RATÓN	GENOTIPADO	% QUIMERISMO		
		30d	60d	90d
h #1	--	16,1	99,1	na*
h #2	++	na	na	na
h #3	+-	na	na	na
h #4	+-	3,0	2,1	4,1
h #5	--	3,5	1,7	1,5
h #6	++	0,0	0,0	0,0
h #7	+-	1,5	2,1	6,4
h #8	++	4,5	5,7	7,3
h #9	+-	2,8	2,4	3,4
m #1	+-	na	na	na
m #2	++	na	na	na
m #3	+-	na	na	na
m #4	+-	na	na	na
m #5	+-	na	na	na
m #6	+-	na	na	na
m #7	+-	na	na	na
m #8	++	na	na	na

*muerto antes del tercer análisis.

3.2. MODELO DE TERAPIA GÉNICA *EX VIVO* EN RATONES DEFICIENTES EN PIRUVATO KINASA ERITROCITARIA.

En nuestro laboratorio hemos demostrado en ratones adultos DPK que la transducción de progenitores hematopoyéticos con un vector retroviral que expresa el gen humano de la piruvato kinasa eritrocitaria, corrige los síntomas patológicos de la enfermedad (Meza et al, enviado para revisión). Basándonos en esto y en los resultados previos de los trasplantes *in utero* para el tratamiento de enfermedades eritrocitarias y defectos enzimáticos (Muench et al., 2004) (Muench et al., 2005), llevamos a cabo un modelo de trasplante *in utero* con progenitores hematopoyéticos procedentes de ratones deficientes en piruvato quinasa eritrocitaria (B19) corregidos con el gen *pklr*.

Se trasplantaron un total de 165 fetos DPK en el día 14,5 de gestación con células procedentes de hermanos de camada transducidas con un vector que expresa la piruvato kinasa eritrocitaria humana y la EGFP como proteína marcadora (ver material

y métodos). Paralelamente, se realizaron cultivos en medio semisólido para determinar el porcentaje de transducción en progenitores hematopoyéticos, que no superó en ningún caso el 40%. De los ratones trasplantados sobrevivió el 6,1% (n=10), debido tanto a abortos post-inyección *in utero* como a muerte perinatal.

El porcentaje de células transducidas presentes en sangre periférica se determinó por citometría de flujo a los 30, 60 y 90 días post -nacimiento. El 40% de los ratones supervivientes mostró quimerismo en sangre periférica tanto a corto como a largo plazo (figura 30A). También se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células del linaje eritroide (Ter119⁺) que expresaban EGFP y se observó que un elevado porcentaje de las células EGFP⁺ totales pertenecían a la serie roja en los 4 ratones injertados (figura 30B).

El número de copias del gen que codifica la EGFP en médula ósea se estimó por Q-PCR y fue de 0,01 copias/célula, lo que confirmó que el porcentaje de injerto de células transducidas en médula ósea era, en promedio, de un 0,8%.

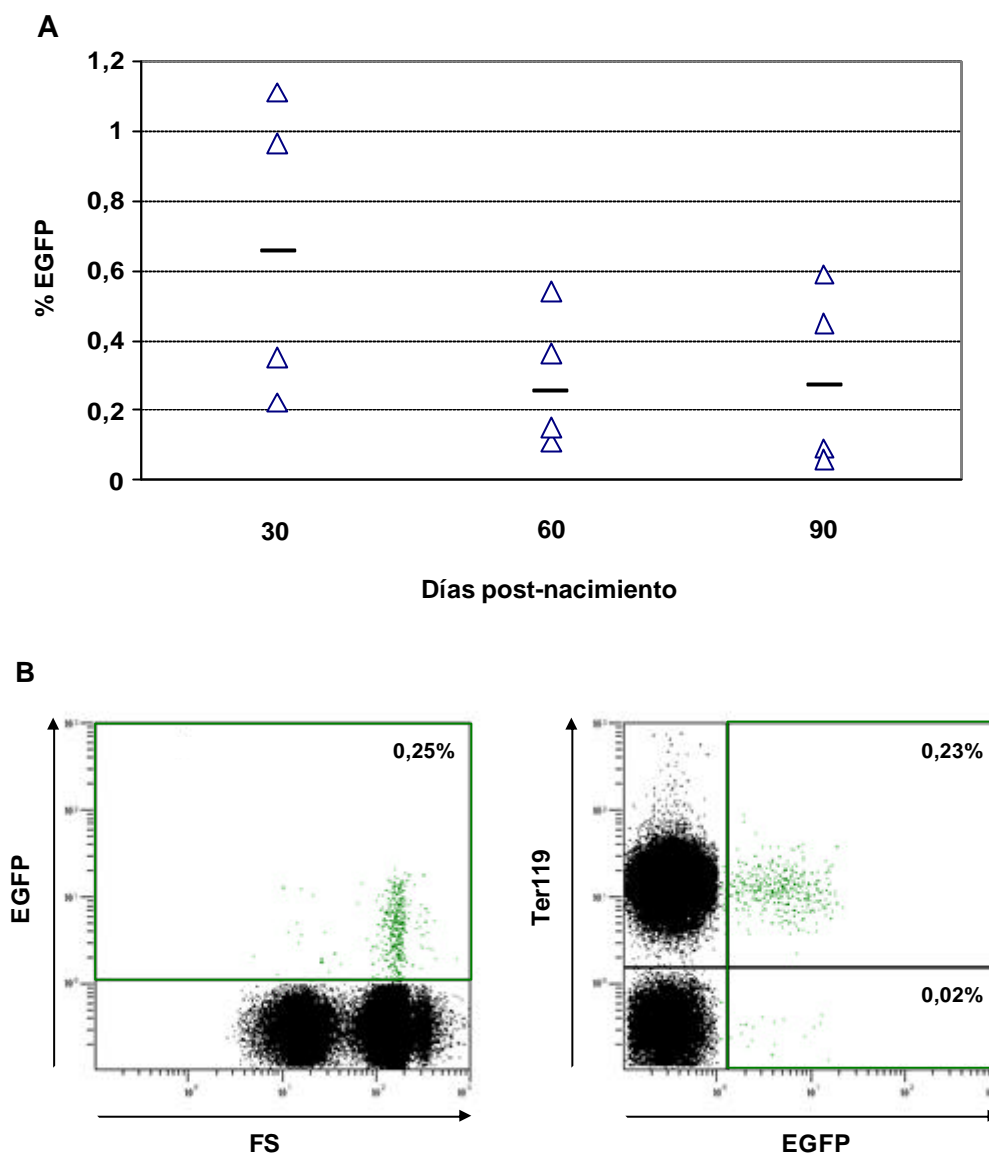


Figura 30. Análisis de quimerismo de ratones trasplantados *in utero* con células transducidas. A) Cinética de injerto de células del EGFP⁺ en ratones DPK trasplantados *in utero* durante los 3 meses siguientes al nacimiento. Cada símbolo corresponde a un ratón. Las líneas corresponden al valor de la mediana ; **B)** Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células EGFP⁺ de un ratón DPK representativo trasplantado *in utero*. En el diagrama de la izquierda se representa el porcentaje total de células que expresan la EGFP. En el diagrama de la derecha se representa el porcentaje de células EGFP⁺ pertenecientes al linaje eritroide (Ter119⁺).

El análisis de los parámetros hematológicos después del nacimiento mostró una ligera mejoría (figura 31B), que en el caso de los eritrocitos representó un aumento significativo de los mismos a los 60 días del nacimiento (Figura 31A).

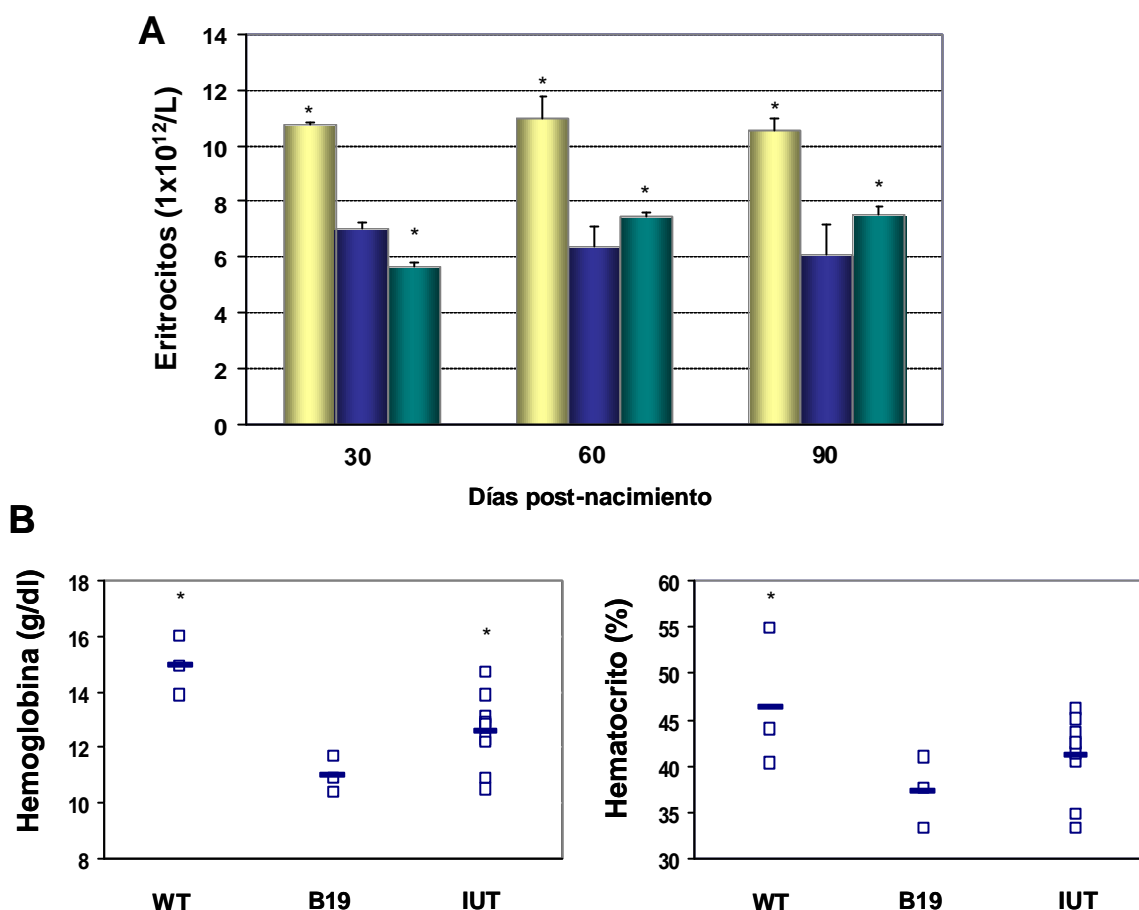


Figura 31. Corrección parcial del fenotipo eritropoyético en ratones DPK trasplantados *in utero* con progenitores hematopoyéticos transducidos con el vector corrector. **A)** Las barras corresponden al número de eritrocitos detectados en sangre periférica en ratones control sanos (■) B19 (■) animales DPK trasplantados *in utero* (■) 30, 60 y 90 días después del nacimiento; **B)** Valores de hemoglobina y hematocrito 90 días después de nacimiento. WT, ratones control sanos; B19, animales DPK; IUT, animales trasplantados *in utero* con células transducidas. Cada cuadrado corresponde a un animal. Las líneas corresponden al valor de la mediana en cada uno de los grupos experimentales. * Diferencias significativas referidas a los ratones B19, $p < 0,05$.

Las diferentes poblaciones de progenitores eritroides se analizaron por citometría de flujo para evaluar si se había producido una restauración de la dinámica de diferenciación eritroide de los animales trasplantados *in utero* (figura 32). En los ratones quiméricos no se observó una aproximación clara de los porcentajes de cada una de las poblaciones eritroides a los valores de los ratones control sanos, salvo en los compartimentos II y IV correspondientes a sangre periférica (figura 33 A, B y C). Al realizar un análisis de la dinámica de diferenciación de los precursores eritroides mediante los porcentajes de variación celular entre compartimentos de progenitores eritroides consecutivos, se observó una aproximación a los porcentajes observados en animales sanos en médula ósea y sangre periférica de los animales trasplantados *in utero*, pero no en bazo (figura 33D).

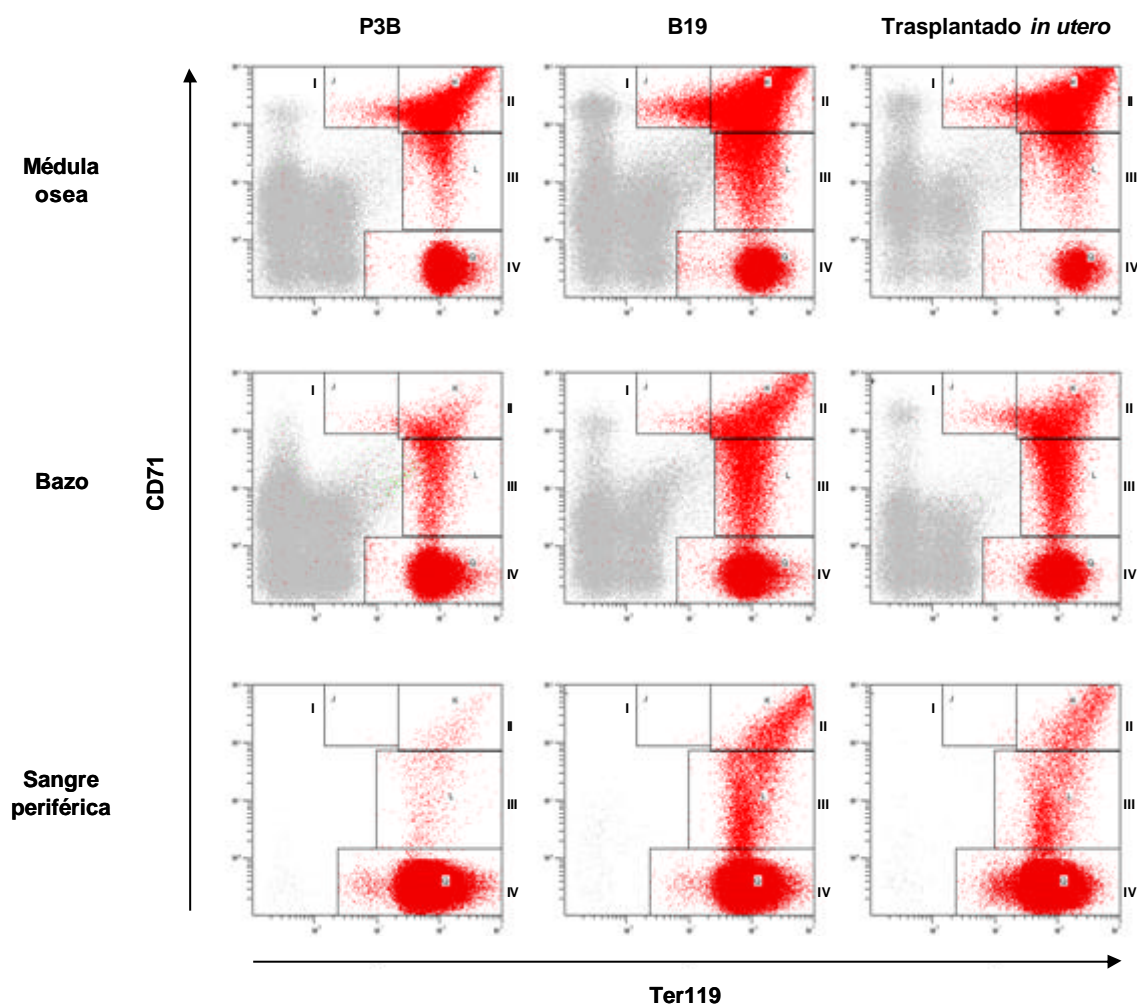


Figura 32. Dinámica de eritrodiferenciación en diferentes compartimentos hematopoyéticos en ratones trasplantados *in utero*. Diagramas representativos y análisis por citometría de flujo de los diferentes pasos de diferenciación eritroide en médula ósea, bazo y sangre periférica. Región I: Proeritroblastos; Región II: Eritroblastos basófilos; Región III: Eritroblastos basófilos tardíos y eritroblastos policromáticos; Región IV: Eritroblastos ortocromáticos y células eritroides maduras.

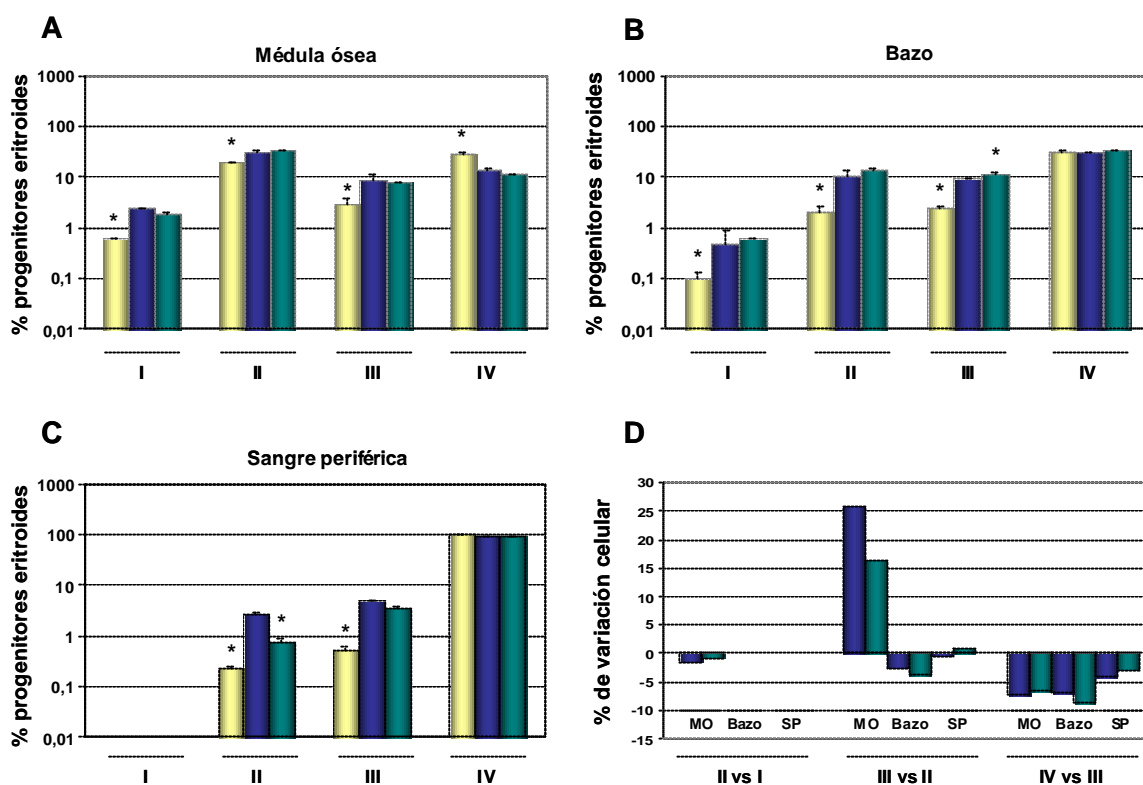


Figura 33. Análisis de poblaciones de precursores eritroides en animales trasplantados *in utero*. Porcentaje de cada una de las poblaciones de progenitores eritroides **A)** en médula ósea, **B)** en bazo y **C)** en sangre periférica de ratones DPK trasplantados *in utero*; **D)** Porcentajes de variación celular entre dos poblaciones de precursores eritroides consecutivas en médula ósea, bazo y sangre periférica.

(■) media de ratones P3B control sin trasplantar; (■) media de ratones DPK sin trasplantar; (■) media de ratones DPK que mostraron quimerismo tras IUT con células corregidas.

Las regiones I, II, III y IV corresponden con las descritas en la figura 24. *Diferencias significativas referidas a los ratones B19, $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos en este modelo de enfermedad insinúan la necesidad de trasplantar un mayor número de células corregidas para restaurar completamente el fenotipo anémico característico de los ratones DPK.

DISCUSIÓN

16. EL TRASPLANTE *IN UTERO* DE POBLACIONES ENRIQUECIDAS EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS ALOGÉNICOS PUEDE INDUCIR ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUESPED

El trasplante *in utero* de células madre hematopoyéticas (IUHSCT) se ha desarrollado en las tres últimas décadas como una alternativa a la terapia postnatal para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades genéticas hereditarias, tanto en modelos animales como en fetos humanos. La necesidad de tratar determinadas enfermedades a edades muy tempranas para evitar el desarrollo del fenotipo patológico de las mismas, junto con los problemas inmunológicos subsiguientes a los trasplantes alogénicos o haploidénticos postnatales, hicieron aun más evidente la conveniencia de desarrollar una terapia celular durante el desarrollo fetal.

Las primeras aproximaciones se realizaron en modelos animales, ratón y oveja principalmente. En estos primeros estudios se pudo observar que la técnica permitía niveles adecuados de quimerismo, sin necesidad de someter a los fetos a tratamiento mieloablativo. Sin embargo, los trasplantes realizados en fetos humanos resultaron no ser tan exitosos, obteniéndose corrección del fenotipo únicamente en individuos que presentaban algún tipo de inmunodeficiencia (Muench, 2005).

La mayor parte de los trasplantes alogénicos en modelos de ratón se han realizado utilizando células procedentes de médula ósea adulta deplecionada en células T. Con ánimo de dar un paso más en la optimización de la técnica y basándonos en la bibliografía previa (Carrier et al., 1995) (Archer et al., 1997), procedimos a realizar el trasplante de poblaciones de médula ósea enriquecidas en progenitores hematopoyéticos.

El porcentaje medio de supervivencia observado en los experimentos en los que se trasplantó médula ósea deplecionada en células T (27%) fue inferior a los reportados en la bibliografía, que estaban comprendidos entre un 50% y un 70% (Hayashi et al., 2002) (Peranteau et al., 2002). Se trasplantó el mismo número de células (5×10^6 células por feto) y las condiciones del trasplante en cuanto a edad de

los fetos y volúmenes inyectados fueron idénticas, salvo que en nuestros experimentos se utilizó 2-2-2 tribromoetanol (avertina) como anestésico mientras que en los casos reportados en la bibliografía se utilizó metoxiflurano. Los anestésicos inhalatorios son más recomendables ya que hay menor riesgo de sobredosis (Gupta y Eger, 2008), por lo que la disminución de la supervivencia observada en nuestros experimentos podría deberse a un efecto adverso de la anestesia sobre los fetos. En esta misma serie de experimentos pudimos observar un incremento de la mortalidad de las hembras preñadas sometidas al procedimiento. Un 22% de las mismas murió por efecto de la anestesia en las 12 horas siguientes al trasplante (datos no mostrados). Por otro lado, el porcentaje de quimerismo observado en los animales supervivientes fue coincidente con el que obtuvieron otros autores en condiciones similares de trasplante (Casal y Wolfe, 2001) (Hayashi et al., 2002) (Peranteau et al., 2002).

Son pocos los datos reportados sobre trasplante alogénico *in utero* de poblaciones enriquecidas en progenitores hematopoyéticos. En los experimentos realizados por Peranteau y col., se demostró que el enriquecimiento de la población trasplantada en células linaje negativas que expresaban los marcadores Sca1 y c-kit (LSK), no afectaba ni a la supervivencia ni al porcentaje de quimerismo (Peranteau et al., 2006). Previamente, nuestro laboratorio había demostrado que el enriquecimiento de las células singénicas trasplantadas *in utero* en progenitores Lin⁻Sca1⁺ mejoraba la supervivencia y los niveles de quimerismo de los ratones trasplantados (Rio et al., 2005). Teniendo en cuenta estos resultados, se realizaron dos series de experimentos utilizando, por un lado, poblaciones de médula ósea enriquecidas en células Sca1⁺, y por otro, células Lin⁻Sca1⁺, y trasplantándolas *in utero* en receptores alogénicos.

Sorprendentemente, los porcentajes de supervivencia y los niveles de quimerismo observados en estos experimentos fueron menores que en aquellos en los que se utilizaron células de médula ósea deplecionada en células T. En 2007 se reportó la evidencia de la existencia de una barrera inmune en los fetos trasplantados *in utero* con células alogénicas (Peranteau et al., 2007). Comparando los porcentajes de quimerismo con los obtenidos en trasplantes singénicos se determinó que en los ratones trasplantados con células alogénicas eran más bajos y además muchos ratones lo perdían al mes del nacimiento. Esta misma observación pudimos reportarla con nuestros experimentos en los que ninguno de los ratones supervivientes de los trasplantados *in utero* con células alogénicas presentaba células del donante más allá de los 30 días postnacimiento.

En este grupo de experimentos, observamos que un 10% de los ratones nacidos presentaban menor tamaño que sus compañeros de camada, mostraban una coloración cutánea oscurecida y morían trascurrida una semana desde su nacimiento. En cortes histológicos de estos neonatos observamos infiltraciones linfocitarias en dermis y epidermis, y un elevado número de células blancas intradérmicas (figura 10). Este fenotipo no era muy acusado pero concordaba con el de aquellos animales que morían por EICH aguda tras un trasplante alogénico en individuos adultos (Heymer, 2002). Para evitar el posible desarrollo de EICH en los ratones trasplantados *in utero*, y así aumentar los porcentajes de supervivencia, se realizó un nuevo grupo de experimentos en los que, se trasplantaron en cada feto células mesenquimales procedentes de tejido adiposo junto con las poblaciones enriquecidas en Sca1⁺ o en Lin⁻Sca1⁺. Ya se había demostrado en nuestro laboratorio que este tipo de células tenían propiedades inmunosupresoras en ratones adultos trasplantados con células de médula ósea alogénica (Yanez et al., 2006). Con esta nueva aproximación *in utero*, no observamos aumento en la supervivencia. Uno de los posibles parámetros que podrían explicar la no efectividad del tratamiento es que el número de células inyectadas no era suficiente para evitar la EICH. Las células mesenquimales son de mayor tamaño que los progenitores hematopoyéticos y tienden a formar agregados con gran facilidad por lo que no era posible inyectar grandes cantidades. Se evaluó el efecto de la inyección intraperitoneal de las células mesenquimales inyectando el 5×10^3 células mesenquimales a día 14,5 de gestación sin añadir poblaciones hematopoyéticas de médula ósea. El resultado de los trasplantes mostró una disminución significativa de la supervivencia (7%), por lo que la vía de administración y el volumen tan reducido en el que se inyectaron, no parecían idóneos para el trasplante de este tipo de células. Chan y colaboradores reportaron en el año 2006 que la inyección intraperitoneal de MSC era la vía de administración más idónea en fetos, obteniendo un 43% de supervivencia dos días después del trasplante en individuos normales. No se ha reportado el porcentaje de supervivencia post-nacimiento en cepas de ratones sanos, pero en ratones mdx (modelo de distrofia muscular de Duchenne) se ha demostrado una supervivencia de tan solo el 11,9% de los ratones trasplantados (Chan et al., 2007), lo que se aproxima bastante a nuestros datos de supervivencia tras trasplante de MSCs.

Las células mesenquimales actúan secretando factores solubles con efecto inmunosupresor que actúan de manera paracrina (Di Nicola et al., 2002) (Bartholomew et al., 2002) (Le Blanc, 2003) (Maitra et al., 2004). Para evitar los problemas asociados

a la inyección intraperitoneal en el feto nos hemos planteado poner en marcha nuevos experimentos inyectando células mesenquimales en el peritoneo de la hembra gestante ensayando dosis mayores de células para encontrar el número idóneo que consiga evitar la EICH.

17. EL TRASPLANTE *IN UTERO* DE PROGENITORES DE HÍGADO FETAL SINGÉNICO CORREGIDOS GENÉTICAMENTE COMO ALTERNATIVA AL TRASPLANTE PRENATAL DE CÉLULAS ALOGÉNICAS

Con el desarrollo de la terapia génica *ex vivo* y de los vectores utilizados en este campo, se planteó la conveniencia de utilizar vectores portadores de genes correctores para la transducción de células procedentes de individuos enfermos, y su posterior reinfusión para el tratamiento de la sintomatología de enfermedades monogénicas. Esta aproximación elimina la problemática relacionada con el trasplante de células alogénicas, que requiere la existencia de un donante compatible y un acondicionamiento del receptor para evitar posibles problemas inmunológicos.

La aplicación de la terapia génica prenatal sería particularmente relevante en el caso de enfermedades en las que la patología se manifiesta en estadios muy tempranos del desarrollo, de tal manera que los individuos nacen mostrando sintomatología irreversible o adquieren el fenotipo patológico a edades muy tempranas (Surbek et al., 2008) (Flake, 2004) (Waddington et al., 2005). Aunque se ha practicado un número importante de trasplantes alogénicos en humanos con resultados alentadores (Muench, 2005), experimentos recientes sugieren que en determinados estadios del desarrollo en los que se realiza el trasplante, el feto ya es inmunocompetente (Peranteau et al., 2007). Por este motivo la posibilidad de obtener células del feto enfermo y corregirlas *ex vivo* adquiere más relevancia.

Las primeras aproximaciones a la terapia génica prenatal en modelos animales se han realizado utilizando células procedentes de médula ósea adulta, y aunque no han sido muy numerosas, sí han demostrado que las poblaciones enriquecidas en progenitores hematopoyéticos y transducidas *in vitro* son capaces de injertar *in utero*

tanto a corto como a largo plazo (Rio et al., 2005) (Bigger et al., 2006) . Este tipo de aproximación con trasplante de células procedentes de individuos adultos, no es aplicable a una futura terapia infundiendo células autólogas en fetos humanos . Por este motivo nos propusimos desarrollar un protocolo de trasplante *in utero* de células procedentes de hígado fetal corregidas genéticamente, en un modelo de ratón que podría trasladarse en un futuro a humanos.

Se ha descrito en numerosas ocasiones que el hígado fetal presenta una capacidad repobladora superior a la de la médula ósea adulta (Rebel et al., 1996) (Pawliuk et al., 1996) (Taylor et al., 2002) , principalmente en trasplantes prenatales (Hayashi et al., 2003) (Oppenheim et al., 2001) (Taylor et al., 2002) (Barker et al., 2001). Aunque en otros trabajos se ha intentado obtener injerto a largo plazo tras el trasplante *in utero* de células de hígado fetal transducidas, no se han logrado niveles de quimerismo superiores al 0,1% (Casal y Wolfe, 2001) . Posiblemente, uno de los problemas deriva del desconocimiento de qué combinación de citoquinas permite mantener la capacidad de injerto y repoblación a largo plazo de los progenitores de hígado fetal, y a su vez la transducción *in vitro* de células madre y progenitores.

En el trabajo presentado en esta memoria hemos comprobado que los progenitores de hígado fetal no manipulados son capaces de repoblar ratones adultos letalmente irradiados y también de generar microquimerismo estable a largo plazo tras un trasplante *in utero*. Cuando intentamos someter a las poblaciones de hígado fetal enriquecidas en progenitores a protocolos de transducción estandar con vectores retrovirales observamos que, a pesar de obtener porcentajes de transducción elevados, estas células veían mermada su capacidad de injerto y repoblación a largo plazo. Además, no lograron detectarse células EGFP⁺ por citometría de flujo en los ratones trasplantados, lo que sugería que la población transducida mantendría pocas células madre hematopoyéticas con capacidad de repoblación *in vivo*. Procedimos a sí a estudiar las condiciones de transducción que permitieran transducir y mantener la capacidad de injerto de las CMHs de hígado fetal.

2.1. LAS CÉLULAS LIN⁺ DE HÍGADO FETAL SE TRANSDUCEN CON ELEVADA EFICIENCIA UTILIZANDO VECTORES LENTIVIRALES DURANTE PERIODOS MUY CORTOS DE INFECCIÓN Y BAJAS MULTIPLICIDADES DE INFECCIÓN

Los vectores lentivirales son capaces de infectar células que no se encuentran en división (Naldini et al., 1996) (Sutton et al., 1998). Por este motivo no se precisa de un periodo de pre-estimulación para proceder a la transducción de las células de interés. Esta característica de los lentivirus nos permitió acortar los protocolos de infección, minimizando así el periodo de cultivo de los progenitores de hígado fetal.

Para desarrollar un protocolo de infección en el que lográramos porcentajes de transducción elevados sin afectar a la capacidad repobladora de las células Lin⁺ de hígado fetal, utilizamos diferentes MOI, tiempos de infección y combinaciones de citoquinas en placas pretratadas o no con retronectina. Cuando se realizó la transducción durante 3 horas, se observó que, en cualquiera de las condiciones utilizadas, el porcentaje de progenitores transducidos era similar, luego ninguna de las condiciones mejoraba significativamente los porcentajes de transducción en cultivo semisólido (figura 13). Las transducciones durante 6 horas revelaron la importancia de la utilización de placas pretratadas con RN, tanto en relación al número de progenitores, como a los porcentajes de transducción. Esta observación es paradójica, ya que está descrito que los progenitores hematopoyéticos se unen al dominio de unión celular del fragmento CH-296 de la fibronectina (Hanenberg et al., 1996), pero la envuelta VSV-G no tiene capacidad para unirse al dominio de unión a heparina, luego no se produciría colocalización célula-virus mediada por la RN. Sin embargo, la unión de los progenitores hematopoyéticos de hígado fetal a la RN parece suficiente para facilitar la aproximación de los virus a la célula diana y favorecer la transducción. La observación de que la utilización de RN favorece la supervivencia de los progenitores hematopoyéticos en cultivo es consistente con resultados obtenidos por otros grupos (Donahue et al., 2001).

Asimismo, observamos que utilizando mSCF, Flt3 y hTPO durante la infección, se alcanzaban porcentajes de células EGFP⁺ superiores al 59%, sin verse afectado el número de CFU-GM totales. Esta combinación de citoquinas se ha utilizado ampliamente para el mantenimiento en cultivo y la transducción de fracciones celulares enriquecidas en células madre y progenitores hematopoyéticos procedentes de médula ósea (Jacome et al., 2009) y cordón umbilical (Ueda et al., 2000). Está

reportado que en el cultivo de células Lin⁻ de hígado fetal la utilización conjunta de mSCF y hTPO promueve supervivencia y expansión de CMH (Matsunaga et al., 1998) (Sitnicka et al., 1996) (Yagi et al., 1999). Por otro lado, se ha descrito que el receptor de Flt-3 se expresa en las CMH de hígado fetal con capacidad de repoblación a largo plazo (LT-HSC) pero no en las procedentes de médula ósea adulta (Adolfsson et al., 2001) (Christensen y Weissman, 2001) (Sitnicka et al., 2002), y parece claro el papel clave que tiene este receptor en el mantenimiento de la hematopoyesis (Yonemura et al., 1997).

La combinación de hIL11 y mSCF mantiene y expande en cultivo las CMH procedentes de médula ósea (Miller y Eaves, 1997) (Albella et al., 1999) y es una combinación estandarizada en nuestro laboratorio, pero no resultó eficaz cuando se utilizó durante la transducción de las células Lin⁻ de hígado fetal. Apoyando nuestra observación Bowie y col. publicaron en el año 2007 que la utilización de hIL11 en el cultivo de progenitores hematopoyéticos de hígado fetal generaba un efecto inhibitorio en la autorrenovación de las células madre hematopoyéticas, que no eran capaces de generar CRUs (Bowie et al., 2006). Por este motivo, el cultivo con mSCF, Flt3 y hTPO, y en ausencia de hIL11, facilitaría la división de las células con capacidad repobladora aumentando por lo tanto los porcentajes de transducción con vectores lentivirales.

2.2. LAS CÉLULAS LIN⁻ DE HÍGADO FETAL TRANSDUCIDAS CON VECTORES LENTIVIRALES DURANTE TIEMPOS CORTOS DE INFECCIÓN MANTIENEN SU CAPACIDAD DE INJERTO HEMATOPOYÉTICO A LARGO PLAZO TRAS TRASPLANTE *IN UTERO*

Se ha reportado que en determinadas enfermedades genéticas no es necesario un elevado porcentaje de células transducidas para corregir el fenotipo del organismo tratado por terapia génica (Persons et al., 2001) (Richard et al., 2004). Por este motivo, y en un intento de manipular lo mínimo los progenitores hematopoyéticos de hígado fetal, utilizamos condiciones mínimas de infección (MOI 5, 3h) en células Lin⁻ de hígado fetal que posteriormente se trasplantaron tanto a ratones adultos letalmente irradiados como a fetos mediante trasplante *in utero*. Para esta serie de experimentos se utilizaron placas no pre-tratadas con RN y la combinación de citoquinas estandarizada en nuestro laboratorio (hIL11 y mSCF) para médula ósea de animales adultos.

Los porcentajes de CFU-GMs EGFP⁺ fueron bastante variables entre experimentos, indicando que estas condiciones mínimas no son repetitivas en cuanto a porcentajes de células transducidas, aunque no se vea afectado el número total de CFU-GMs. Posiblemente el tiempo de infección fue demasiado reducido y el estado inicial de las células en cuanto a proliferación introdujo gran variabilidad en el protocolo.

Las células transducidas en condiciones de manipulación mínima fueron capaces de repoblar adultos irradiados, tanto a corto como a largo plazo (hasta 90 días), pero los porcentajes de células EGFP⁺ detectados en sangre periférica no superaron en ningún caso el 1%. En los animales trasplantados *in utero*, el quimerismo se mantuvo estable hasta los 180 días post-nacimiento. Además, se pudo observar quimerismo mantenido e incluso incrementado respecto a los donantes trasplantados *in utero* en receptores secundarios, hasta los 90 días postrasplante (figura 17), lo que indicó que las células de hígado fetal conservaban su capacidad de injerto y repoblación a largo plazo. Al analizar el número de copias del provirus integrado en médula ósea y en bazo por Q-PCR, se observó que en los ratones con mayor injerto no se alcanzaban 0,1 copias por célula, lo que corroboró niveles de transducción de CMHs muy reducidos.

La capacidad de repoblación a largo plazo de las células Lin⁻ de hígado fetal transducidas durante 6h con una MOI de 10 se mantuvo, respecto a los valores obtenidos con mínima manipulación. De nuevo, la combinación de citoquinas utilizada fue determinante en los porcentajes de transducción de progenitores, superando el 80% cuando se utilizó mSCF, Flt3 y hTPO en presencia de retronectina. No se ha reportado ningún estudio en el que se hayan utilizado tiempos tan reducidos de infección para transducir progenitores hematopoyéticos con vectores retro o lentivirales. En esta memoria demostramos, por tanto, por primera vez, que para la transducción de progenitores hematopoyéticos de hígado fetal, no es necesario un periodo prolongado de exposición al vector para obtener muy elevadas eficiencias de transducción, debido probablemente al estado proliferativo en que se encuentran estas células.

Los porcentajes de células EGFP⁺ observados en animales adultos trasplantados no fueron tan elevados como los observados en CFU-GMs, pero se conservaron a lo largo del tiempo, incluso en receptores secundarios, y se pudieron observar en los distintos linajes hematopoyéticos así como en sangre periférica, médula ósea y bazo. Estos resultados ponían de manifiesto la transducción de células madre o progenitores

hematopoyéticos muy primitivos , que consiguieron repoblar los diferentes tejidos hematopoyéticos generando células de todos los linajes.

En los dos grupos de animales trasplantados *in utero* pudimos observar que las combinaciones de citoquinas utilizadas preservaban la capacidad de injerto y repoblación a largo plazo de los progenitores hematopoyéticos de hígado fetal tras 6 horas de cultivo. Cuando se utilizó la combinación de citoquinas mSCF, Flt3 y hTPO en placas pretratadas con retronectina, los niveles de quimerismo disminuyeron sensiblemente frente a los obtenidos tras el trasplante *in utero* de células de hígado fetal frescas (86%), transducidas en condiciones de manipulación mínimas (73%) o transducidas durante 6h en presencia de mSCF y hIL11 (68%) (tablas VI y VII). Aunque el 34% de ratones quiméricos observado es la mitad de lo esperado, coincide con los porcentajes de quimerismo publicados por otros autores cuando se trasplantaron *in utero* células hematopoyéticas de médula ósea alogénica (Hayashi et al., 2004) o progenitores hematopoyéticos de médula ósea adulta transducidos *in vitro* (Rio et al., 2005).

La disminución en el porcentaje de quimerismo indicada en el párrafo anterior podría deberse a la existencia de algún factor que impidiera el injerto de estas células, por lo que sometimos a los ratones a estudios de respuesta inmune para averiguar si el mayor porcentaje de proteína exógena generado por una mayor cantidad de células transducidas era el causante de este fallo de injerto.

2.3. LOS RATONES TRASPLANTADOS *IN UTERO* CON CÉLULAS TRANSDUCIDAS SON CAPACES DE GENERAR UNA RESPUESTA INMUNE FRENTE A EGFP

Uno de los motivos principales por los que el trasplante *in utero* de células hematopoyéticas supone un avance frente al trasplante postnatal derivaría del estado preinmune del feto en el momento de la inyección. No obstante , como ya se ha indicado previamente, cada vez existen más evidencias de que esta situación inmunoprivilegiada para las células del donante no es tan eficaz como se esperaba (Peranteau et al., 2007) . A esta reacción del sistema inmune fetal frente a células no compatibles, podemos sumarle la ya suficientemente reportada inmunogenicidad que generan determinados vectores virales o transgenes cuando se inyectan directamente en el feto (Waddington et al., 2005) . De esta manera, existen indicios suficientes para

pensar que existe una inmunidad fetal que, a pesar de no ser exactamente igual que la de un individuo adulto, es capaz de generar una reacción de rechazo frente a diferentes elementos extraños para el sistema inmune en desarrollo.

Se ha descrito la existencia de una respuesta inmune frente a transgenes expresados por células trasplantadas en animales adultos sometidos o no a acondicionamiento previo al trasplante (Puig et al., 2002) (Morris et al., 2004) (Stripecke et al., 1999). La molécula más estudiada y sobre la que existen más evidencias de su inmunogenicidad es la EGFP. No obstante, también se ha podido demostrar que otras proteínas xenogénicas expresadas por células transducidas, como la proteína fluorescente amarilla (EYFP) (Morris et al., 2004), la β -galactosidasa (Izembart et al., 1999) y la neomicina fosfotransferasa (neo) (Heim et al., 2000), son capaces de generar respuesta inmune en los receptores. Además, existen otras proteínas no xenogénicas, como la α -L-iduronidasa, que trasplantadas en animales deficientes son capaces de desencadenar una reacción inmune en animales injertados con células corregidas (Lutzko et al., 1999). En ningún caso, sin embargo, se ha reportado inmunogenicidad frente a proteínas xenogénicas expresadas por células trasplantadas *in utero*.

La disminución del porcentaje de animales injertados en el grupo de ratones trasplantados *in utero* con células transducidas en condiciones óptimas (6 horas de infección con LV, MOI 10 y mSCF, Flt3 y hTPO en placas pretratadas con RN), sin verse afectada la supervivencia, nos hizo sospechar de la existencia de un mecanismo de rechazo de las células trasplantadas en estos animales.

Los ensayos de respuesta humoral revelaron que un 61% de los ratones trasplantados presentaban anticuerpos frente a EGFP en suero. Estos ratones no tenían células EGFP⁺ en sangre periférica aunque algunos de ellos (26%) presentaron injerto a largo plazo con células no transducidas (figura 27). Con los ensayos de respuesta celular frente a EGFP se comprobó que el 33,3% de los ratones analizados presentaba reacción celular anti-EGFP. Asimismo, el 22,2% de los ratones reinmunizados con EGFP recombinante mostraron respuesta secundaria evidente. Ninguno de los ratones sin anticuerpos frente al transgen en suero, ni células hematopoyéticas que expresaban EGFP presentó respuesta celular o respuesta secundaria frente a EGFP. Por otro lado, los ratones con células EGFP⁺ en sangre periférica (8%) no presentaban anticuerpos frente a EGFP en suero y no mostraron

respuesta celular ni repuesta secundaria frente a la EGFP tras la inyección de EGFP recombinante a los 5 meses de edad (figura 28).

Todos estos resultados indican, por primera vez, que animales trasplantados *in utero* con células transducidas con LV son capaces de generar una respuesta inmune completa (humoral y celular) y específica frente a EGFP. Esta reacción inmune provoca el rechazo de las células EGFP⁺ generando fallo de injerto en la mayoría de los casos. Es significativo que un porcentaje de ratones fueron capaces de generar tolerancia a EGFP tras la inyección de células transducidas y mantuvieron el injerto a largo plazo de células EGFP⁺. La tolerancia a EGFP y a otros genes exógenos en ratones adultos acondicionados está ampliamente descrita (Rosenzweig et al., 1999) (Carter et al., 1992) (Heim et al., 2000) (Kang et al., 2001). En los trasplantes prenatales, el fenómeno de tolerancia a células alogénicas ha sido descrito anteriormente y utilizado para favorecer el quimerismo completo tras un trasplante postnatal (Carrier et al., 1995) (Hayashi et al., 2002) (Peranteau et al., 2002). Sin embargo, a pesar de que existen diferentes modelos animales en los que se ha conseguido el injerto de células transducidas que expresan transgenes a largo plazo tras trasplante *in utero* (Kantoff et al., 1989) (Lutzko et al., 1999) (Rio et al., 2005) (Bigger et al., 2006) (Chan et al., 2007) (Guillot et al., 2008), todavía no se había estudiado la existencia de tolerancia a transgenes en fetos ni su potencial uso terapéutico.

Los datos previos obtenidos en nuestro laboratorio (Rio et al., 2005) y por otros autores (Bigger et al., 2006) no parecían revelar la existencia de respuesta inmune frente al transgen en trasplantes *in utero* singénicos. En estos modelos, se utilizaron células procedentes de médula ósea adulta para el trasplante. La utilización de hígado fetal implica la inyección de un mayor número de células T ya que este tejido presenta una elevada cantidad de las mismas (Lindton et al., 2000) (Toivanen et al., 1981) (Lindton et al., 2003). Renda y col. publicaron en el año 2000 la existencia de células T con reordenamiento de TCR en hígados fetales humanos de la semana 13 de gestación. Esto justificaría un fallo de injerto de células de hígado fetal trasplantadas *in utero* en receptores alogénicos (Orlandi et al., 1996) (Westgren et al., 1996). Apoyando todos estos resultados, se ha descrito que en modelos de ratón de trasplante *in utero* de células alogénicas, el injerto se produce cuando hay una delección parcial de los linfocitos reactivos del donante (Kim et al., 1999) (Hayashi et al., 2002) (Peranteau et al., 2002). En el caso de trasplante *in utero* de células singénicas de hígado fetal

transducidas, la expresión del transgen podría desencadenar el inicio de una respuesta inmune que daría lugar al fallo de injerto de las células que expresan EGFP.

18. EL TRASPLANTE *IN UTERO* DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS COMO ALTERNATIVA AL TRASPLANTE POSTNATAL EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD

Como ya se ha comentado en diversas secciones de esta memoria, la terapia prenatal se presenta como una alternativa terapéutica aplicable al tratamiento de enfermedades hereditarias que puedan diagnosticarse en estadios tempranos del desarrollo.

La Anemia de Fanconi y la Deficiencia en Piruvato Kinasa Eritrocitaria son dos enfermedades que por sus características han sido propuestas como posibles candidatas para su tratamiento mediante trasplante *in utero* de células hematopoyéticas (Muench, 2005) (Steiner y Gallagher, 2007) (Afriat et al., 1995) (D'Andrea y Grompe, 1997). Con objeto de estudiar el comportamiento de los progenitores hematopoyéticos, sanos o corregidos genéticamente y trasplantados *in utero*, y la utilidad de esta técnica para el tratamiento de enfermedades genéticas, nos centramos en dos abordajes diferentes, uno de terapia celular y otro de terapia génica, para su aplicación en modelos animales de enfermedad.

3.1. LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS SANOS TRASPLANTADOS *IN UTERO* EN RATONES AF-D1 PUEDEN DESARROLLAR VENTAJA PROLIFERATIVA FRENTE A LA HEMATOPOYESIS ENDÓGENA

En el año 2006, Navarro y col. describieron el fenotipo de un modelo de ratón AF-D1. Este modelo, que posee una mutación hipomórfica en el exón 27 del gen *Brca2/Fancd1*, presenta un claro defecto proliferativo en el compartimento de las CMH. Además presenta inestabilidad cromosómica similar a la que muestran los

pacientes de AF, y también hipersensibilidad a agentes entrecruzantes del ADN, como la mitomicina C, y predisposición al cáncer (Cohn y D'Andrea, 2008).

Este modelo de ratón era idóneo para demostrar la potencial ventaja proliferativa de células sanas cuando son trasplantadas en fetos enfermos (Muench, 2005) (Waddington et al., 2005). Para demostrar esta premisa realizamos una aproximación de IUHSCT. Los progenitores hematopoyéticos de médula ósea adulta procedente de animales singénicos sanos se inyectaron en fetos sanos, heterocigotos y homocigotos para la mutación. En todos los casos analizados se observó microquimerismo salvo en el ratón h#1, que mostró un quimerismo completo dos meses después del trasplante (tabla X). Este ratón resultó ser homocigoto para la mutación, demostrándose la ventaja proliferativa de las células sanas trasplantadas, las cuales eran capaces de desplazar por completo la hematopoyesis endógena defectuosa. Por alguna razón no bien entendida por el momento, no observamos el mismo comportamiento del injerto en otro ratón homocigoto para la mutación FancD1 (h#5).

En este modelo de ratón, el número de células trasplantadas es determinante para que los progenitores sanos desplacen a los del receptor en animales adultos (Navarro et al., 2006) (Rio et al., 2008). En la literatura publicada se demuestra la necesidad de trasplantar al menos 2×10^7 células de médula ósea sana en ratones AF-D1 adultos no acondicionados para desplazar la hematopoyesis de los ratones enfermos por una hematopoyesis sana (Navarro et al., 2006). Cuando se trasplantaron progenitores hematopoyéticos (Lin^-) en animales sometidos a un leve acondicionamiento bastaron 5×10^5 células sanas para conseguir reconstitución (Rio et al., 2008). Debido al pequeño tamaño del feto y a la condición preinmune en la que se encuentra en el momento de la inyección, 5×10^5 células Lin^- podría ser un número adecuado para el trasplante prenatal. Sin embargo, las limitaciones técnicas inherentes al trasplante *in utero* hacen que el número de progenitores trasplantados siempre esté comprendido en un rango (entre 3×10^5 y 5×10^5). La razón por la que el ratón h#1 presentó niveles tan elevados de quimerismo pudo deberse a que recibió una dosis más elevada que h#5, si bien este hecho debería ser confirmando con experimentos adicionales.

El hecho de que todos los ratones analizados presenten quimerismo independientemente de su genotipo, apoya la tesis de que el trasplante *in utero* permite injertos de progenitores hematopoyéticos singénicos sin necesidad de mieloablación, demostrando de nuevo su idoneidad para terapia en casos en los que se conozca la existencia de la enfermedad antes del nacimiento (Rio et al., 2005) (Bigger et al., 2006).

3.2. LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE RATONES DPK TRANSDUCIDOS CON VECTORES RETROVIRALES QUE PORTAN EL GEN CORRECTOR Y TRASPLANTADOS *IN UTERO* RESTAURAN PARCIALMENTE EL FENOTIPO ANÉMICO

La deficiencia en piruvato kinasa eritrocitaria es una enfermedad autosómica recesiva que se manifiesta en pacientes con diferentes grados de severidad. Aunque la esplenectomía es una alternativa que ha mostrado eficacia terapéutica, en ocasiones ha sido necesario llevar a cabo trasplantes hematopoyéticos alogénicos que se han realizado con éxito (Tanphaichitr et al., 2000) (Suvatte et al., 1998). Actualmente, sin embargo, no existe un tratamiento definitivo para los pacientes con manifestaciones patológicas severas sin donante apropiado (Zauch et al., 2001) (Richard et al., 2004) (Cazzola, 2005), por este motivo, la terapia génica podría ser una buena alternativa para el tratamiento de la DPK.

En nuestro laboratorio hemos corregido recientemente el fenotipo anémico en ratones DPK utilizando un protocolo de terapia génica *ex vivo* con vectores retrovirales (Meza et al., enviado para revisión). Dado que la DPK es una enfermedad que se puede diagnosticar durante el desarrollo fetal (Steiner y Gallagher, 2007) (Afriat et al., 1995), es una buena candidata al tratamiento mediante trasplante *in utero* de progenitores hematopoyéticos corregidos genéticamente. Aplicando un protocolo de transducción de células de médula ósea seguido de trasplante prenatal, observamos células corregidas con el vector bicistrónico RPK/EGFP en sangre periférica (figura 30). Este resultado podría deberse a una ventaja selectiva de los progenitores eritroides corregidos (Mintz et al., 1984) (Flake, 2004). Además, se ha podido comprobar la existencia de eritrocitos corregidos en sangre periférica.

Para el tratamiento de enfermedades metabólicas, el porcentaje de células que deben expresar el transgen terapéutico para obtener una corrección del fenotipo enfermo es muy variable. Se ha reportado que un 10% de células corregidas en médula ósea en un modelo de ratón deficiente en piruvato kinasa (CBA-Pk-1slc/Pk-1slc) es suficiente para restaurar los niveles de la proteína tras un trasplante postnatal en animales irradiados (Richard et al., 2004). En nuestro modelo animal hemos observado previamente que es necesario alcanzar al menos un 25% de células corregidas en médula ósea para ver una corrección sostenida del fenotipo anémico (Meza et al., enviado para revisión). Sorprendentemente, en esta memoria hemos observado que cuando se realiza el mismo tipo de trasplante en fetos no

acondicionados, un 0,8% de células corregidas en médula es suficiente para generar una modesta corrección del fenotipo; lo que se asemeja al efecto conseguido con un 8-10% de células corregidas en médula en un trasplante postnatal (Meza et al., enviado para revisión). Estos resultados sugieren que la inyección de células corregidas en estadios tempranos del desarrollo podría ser más eficaz para el tratamiento de la DPK.

A pesar de que en los animales trasplantados *in utero* no se logró una reversión completa del fenotipo anémico, sí pudimos observar una normalización de la dinámica de diferenciación eritropoyética en médula ósea y sangre periférica (figuras 32 y 33). En ratones adultos DPK trasplantados con células corregidas genéticamente se consiguió normalización en médula ósea y en bazo (Meza et al., enviado para revisión). Los pequeños porcentajes de quimerismo observados en los animales trasplantados *in utero* fueron suficientes para mejorar la eritropoyesis en médula ósea, y para generar eritrocitos corregidos en sangre periférica.

19. CONSIDERACIONES ÚLTIMAS

La terapia prenatal se plantea como una nueva alternativa terapéutica para determinadas enfermedades que requieren un abordaje terapéutico temprano, ya que las manifestaciones patológicas tienen lugar en estadios tempranos del desarrollo.

En este manuscrito se han puesto de manifiesto diferentes estrategias de trasplante *in utero* de progenitores hematopoyéticos tanto corregidos genéticamente, como sin manipular. De aplicarse, cada tipo de enfermedad y cada individuo requerirán un tratamiento prenatal específico. No hay que olvidar que la disponibilidad de células compatibles supone un impedimento para la terapia celular. Por este motivo, el trasplante autólogo de células fetales corregidas *ex vivo* se revela como una solución interesante a los problemas de disponibilidad de donantes y de respuesta inmune frente a células con disparidad de HLA.

Con nuestros estudios hemos demostrado que la inyección de células expresando transgenes en estadio fetal también puede generar respuesta inmune en el donante. Esto es un problema a tener en cuenta de cara a la terapia, ya que el sistema inmune del receptor en desarrollo podría rechazar las células corregidas, impidiendo, por lo tanto, la acción del transgen terapéutico. Además de utilizar proteínas terapéuticas

cuya inmunogenicidad sea mínima, la cantidad de células modificadas a infundir deberá ser reducida al mínimo necesario para conseguir un efecto terapéutico, evitando que una dosis elevada de células pudiera despertar una respuesta inmune. La utilización de promotores débiles, como el promotor del *vav*, que no permitan niveles de expresión de transgen elevados también ha de ser considerada (Almarza et al., 2007) para evitar el desarrollo de una respuesta inmune frente a la proteína exógena.

El trasplante *in utero* de progenitores hematopoyéticos en modelos animales de enfermedad es una aproximación terapéutica útil, pero es necesario determinar el número de células transducidas necesarias para que la terapia sea efectiva, teniendo en cuenta los requerimientos específicos de cada enfermedad a tratar.

CONCLUSIONES

1. Los ratones trasplantados *in utero* con células Lin⁻Sca1⁺ alogénicas pueden desarrollar enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda, limitando la supervivencia de los animales trasplantados.
2. Los progenitores hematopoyéticos de hígado fetal pueden ser transducidos muy eficazmente (hasta un 80%) con vectores lentivirales en periodos muy cortos de infección (6 horas) y bajas multiplicidades de infección (MOI = 10 pfu/célula).
3. La estimulación de progenitores de hígado fetal con mSCF, Flt3 y hTPO y la presencia de la retronectina durante el proceso de infección favorece significativamente la transducción de estas células con vectores lentivirales.
4. El trasplante *in utero* de progenitores hematopoyéticos de hígado fetal transducidos en condiciones optimizadas permite el injerto multilínaje a largo plazo en los diferentes órganos hematopoyéticos del receptor.
5. Los fetos de ratón pueden desarrollar una respuesta inmune, tanto humoral como celular, frente a proteínas transgénicas, tales como la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), lo que puede provocar el rechazo de las células que expresan la proteína transgénica.
6. Los ratones trasplantados *in utero* en los que se ha detectado presencia de células EGFP⁺ no presentan anticuerpos ni respuesta celular específica frente a la proteína transgénica, indicando que en determinadas circunstancias el animal puede tolerizar los transgenes exógenos.
7. En el modelo de ratón deficiente en AF-D1, los progenitores hematopoyéticos procedentes de ratones singénicos sanos pueden injertar *in utero* y desarrollar una ventaja proliferativa frente a las células hematopoyéticas endógenas.
8. Los progenitores de médula ósea de ratones deficientes en piruvato quinasa eritrocitaria (DPK) transducidos con un vector retroviral que porta el gen humano RPK, injertan en ratones singénicos DPK trasplantados *in utero* y corrigen parcialmente su fenotipo anémico.

1. Mice transplanted *in utero* with allogeneic LⁱⁿSca1⁺ cells can develop acute graft versus host disease (GVHD), limiting the survival of the transplanted animals.
2. Fetal liver hematopoietic progenitors can be transduced very efficiently (up to 80%) with lentiviral vectors, using very short infection periods (6 hours) and low multiplicities of infection (MOI = 10 pfu/cell).
3. The stimulation of fetal liver progenitors with mSCF, Flt3 γ hTPO in presence of retronectin, favors significantly their transduction with lentiviral vectors.
4. In utero transplantation of lentivirally transduced fetal liver hematopoietic progenitors mediates a long term and multilineage engraftment in the different hematopoietic organs of the receptor.
5. Mouse fetus can develop humoral and cellular immune-responses against exogenous transgenic proteins, like the enhanced green fluorescent protein (EGFP), after in utero transplantation of hematopoietic transduced progenitors. This response can induce the rejection of the cells expressing the transgenic protein.
6. Mice engrafted in utero with EGFP⁺ cells do not develop antibodies against the exogenous protein, nor a cellular specific response, indicating EGFP tolerization.
7. In a FA-D1 deficient mouse model, the IUT of syngeneic healthy hematopoietic progenitors can engraft and develop a proliferative advantage to endogenous FA-D1 hematopoietic cells.
8. In utero transplantation of genetically corrected bone marrow progenitors from pyruvate kinase deficient (PKD) mice, mediates the engraftment of PKD mice, partially correcting the anaemic phenotype of the animals.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adolfsson, J., Borge, O. J., Bryder, D., Theilgaard -Monch, K., Astrand -Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S. E. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self -renewal capacity. *Immunity* 15, 659-669.
2. Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A. , *et al.* (2005). Identification of Flt3+ lympho -myeloid stem cells lacking erythro -megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295-306.
3. Afriat, R., Lecolier, B., Prehu, M. O., Sauvanet, E., Bercau, G., Audit, I., and Galacteros, F. (1995). [Prenatal diagnosis of homozygous pyruvate kinase deficiency]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 24, 81-84.
4. Aiuti, A., Bachoud -Levi, A. C., Blesch, A., Brenner, M. K., Cattaneo, F., Chiocca, E. A., Gao, G., High, K. A., Leen, A. M., Lemoine, N. R. , *et al.* (2007). Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 2). *Gene Ther* 14, 1555-1563.
5. Aiuti, A., Cassani, B., Andolfi, G., Mirolo, M., Biasco, L., Recchia, A., Urbinati, F., Valacca, C., Scaramuzza, S., Aker, M., *et al.* (2007). Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA -SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J Clin Invest* 117, 2233-2240.
6. Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L., Scaramuzza, S., Andolfi, G., Mirolo , M., Brigida, I. , *et al.* (2009). Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 360, 447-458.
7. Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F. , *et al.* (2002). Correction of ADA -SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-2413.
8. Aiuti, A., Vai, S., Mortellaro, A., Casorati, G., Ficara, F., Andolfi, G., Ferrari, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Ochs, H. D. , *et al.* (2002). Immune reconstitution in ADA -SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med* 8, 423-425.
9. Akkina, R. K., Walton, R. M., Chen, M. L., Li, Q. X., Planelles, V., and Chen, I. S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1 -based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70, 2581-2585.
10. Albella, B., Segovia, J. C., Guenechea, G., Pragnell, I. B., and Bueren, J. A. (1999). Preserved long -term repopulation and differentiation properties of hematopoietic grafts subjected to ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin 11. *Transplantation* 67, 1348-1357.
11. Albritton, L. M., Kim, J. W. , Tseng, L., and Cunningham, J. M. (1993). Envelope -binding domain in the cationic amino acid transporter determines the host range of ecotropic murine retroviruses. *J Virol* 67, 2091-2096.
12. Alexander, B. L., Ali, R. R., Alton, E. W., Bainbridge, J. W., Braun, S., Cheng, S. H., Flotte, T. R., Gaspar, H. B., Grez, M., Griesenbach, U. , *et al.* (2007). Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 1). *Gene Ther* 14, 1439-1447.
13. Alfirevic, Z., and von Dadelszen, P. (2003). Instruments for chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000114.

14. Almarza, E., Rio, P., Meza, N. W., Aldea, M., Agirre, X., Guenechea, G., Segovia, J. C., and Bueren, J. A. (2007). Characteristics of lentiviral vectors harboring the proximal promoter of the *vav* proto-oncogene: a weak and efficient promoter for gene therapy. *Mol Ther* 15, 1487-1494.
15. Archer, D. R., Turner, C. W., Yeager, A. M., and Fleming, W. H. (1997). Sustained multilineage engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice after in utero transplantation. *Blood* 90, 3222-3229.
16. Ashizuka, S., Peranteau, W. H., Hayashi, S., and Flake, A. W. (2006). Busulfan-conditioned bone marrow transplantation results in high-level allogeneic chimerism in mice made tolerant by in utero hematopoietic cell transplantation. *Exp Hematol* 34, 359-368.
17. Bacchetti, S., and Graham, F. L. (1977). Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 1590-1594.
18. Bambach, B. J., Moser, H. W., Blakemore, K., Corson, V. L., Griffin, C. A., Noga, S. J., Perlman, E. J., Zuckerman, R., Wenger, D. A., and Jones, R. J. (1997). Engraftment following in utero bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy. *Bone Marrow Transplant* 19, 399-402.
19. Barese, C. N., Goebel, W. S., and Dinauer, M. C. (2004). Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther* 4, 1423-1434.
20. Barker, J. E., Deveau, S., Lessard, M., Hamblen, N., Vogler, C., and Levy, B. (2001). In utero fetal liver cell transplantation without toxic irradiation alleviates lysosomal storage in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Blood Cells Mol Dis* 27, 861-873.
21. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., et al. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30, 42-48.
22. Bartolome, J., Porta, F., Lafranchi, A., Rodriguez-Molina, J. J., Cela, E., Cantalejo, A., Fernandez-Cruz, E., Gomez-Pineda, A., Ugazio, A. G., Notarangelo, L. D., and Gil, J. (2002). B cell function after haploidentical in utero bone marrow transplantation in a patient with severe combined immunodeficiency. *Bone Marrow Transplant* 29, 625-628.
23. Berger, C., Huang, M. L., Gough, M., Greenberg, P. D., Riddell, S. R., and Kiem, H. P. (2001). Nonmyeloablative immunosuppressive regimen prolongs in vivo persistence of gene-modified autologous T cells in a nonhuman primate model. *J Virol* 75, 799-808.
24. Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I., and Dick, J. E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 4, 1038-1045.
25. Bigger, B. W., Siapati, E. K., Mistry, A., Waddington, S. N., Nivsarkar, M. S., Jacobs, L., Perrett, R., Holder, M. V., Ridler, C., Kemball-Cook, G., et al. (2006). Permanent partial phenotypic correction and tolerance in a mouse model of hemophilia B by stem cell gene delivery of human factor IX. *Gene Ther* 13, 117-126.
26. Blakemore, K., Hattenburg, C., Stetten, G., Berg, K., South, S., Murphy, K., and Jones, R. (2004). In utero hematopoietic stem cell transplantation with haploidentical donor adult bone marrow in a canine model. *Am J Obstet Gynecol* 190, 960-973.
27. Blazar, B. R., Taylor, P. A., McElmurry, R., Tian, L., Panoskaltsis-Mortari, A., Lam, S., Lees, C., Waldschmidt, T., and Vallera, D. A. (1998). Engraftment of severe combined immune deficient mice receiving allogeneic bone marrow via in utero or postnatal transfer. *Blood* 92, 3949-3959.

28. Blazar, B. R., Taylor, P. A., and Valleria, D. A. (1995). Adult bone marrow -derived pluripotent hematopoietic stem cells are engraftable when transferred in utero into moderately anemic fetal recipients. *Blood* 85, 833-841.
29. Blazar, B. R., Taylor, P. A., and Valleria, D. A. (1995). In utero transfer of adult bone marrow cells into recipients with severe combined immunodeficiency disorder yields lymphoid progeny with T- and B-cell functional capabilities. *Blood* 86, 4353-4366.
30. Blomer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M., and Gage, F. H. (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71, 6641-6649.
31. Bowie, M. B., Kent, D. G., Copley, M. R., and Eaves, C. J. (2007). Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells. *Blood* 109, 5043-5048.
32. Bowie, M. B., McKnight, K. D., Kent, D. G., McCaffrey, L., Hoodless, P. A., and Eaves, C. J. (2006). Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J Clin Invest* 116, 2808-2816.
33. Bradley, T. R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44, 287-299.
34. Buchsacher, G. L., Jr., and Wong-Staal, F. (2000). Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95, 2499-2504.
35. Bunting, K. D. (2002). ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 20, 11-20.
36. Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8033-8037.
37. Caplan, A. L., and Wilson, J. M. (2000). The ethical challenges of in utero gene therapy. *Nat Genet* 24, 107.
38. Carrier, E., Lee, T. H., Busch, M. P., and Cowan, M. J. (1995). Induction of tolerance in nondefective mice after in utero transplantation of major histocompatibility complex-mismatched fetal hematopoietic stem cells. *Blood* 86, 4681-4690.
39. Carter, R. F., Abrams-Ogg, A. C., Dick, J. E., Kruth, S. A., Valli, V. E., Kamel-Reid, S., and Dube, I. D. (1992). Autologous transplantation of canine long-term marrow culture cells genetically marked by retroviral vectors. *Blood* 79, 356-364.
40. Casal, M. L., and Wolfe, J. H. (2001). In utero transplantation of fetal liver cells in the mucopolysaccharidosis type VII mouse results in low-level chimerism, but overexpression of beta-glucuronidase can delay onset of clinical signs. *Blood* 97, 1625-1634.
41. Case, S. S., Price, M. A., Jordan, C. T., Yu, X. J., Wang, L., Bauer, G., Haas, D. L., Xu, D., Stripecke, R., Naldini, L., et al. (1999). Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2988-2993.
42. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., et al. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.

43. Cazzola, M. (2005). Pyruvate kinase deficiency. *Haematologica* 90, 1-2.
44. Chan, J., Waddington, S. N., O'Donoghue, K., Kurata, H., Guillot, P. V., Gotherstrom, C., Themis, M., Morgan, J. E., and Fisk, N. M. (2007). Widespread distribution and muscle differentiation of human fetal mesenchymal stem cells after intrauterine transplantation in dystrophic mdx mouse. *Stem Cells* 25, 875-884.
45. Cheng, N. C., van de Vrugt, H. J., van der Valk, M. A., Oostra, A. B., Krimpenfort, P., de Vries, Y., Joenje, H., Berns, A., and Arwert, F. (2000). Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog Fanca. *Hum Mol Genet* 9, 1805-1811.
46. Cheung, M. C., Goldberg, J. D., and Kan, Y. W. (1996). Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nat Genet* 14, 264-268.
47. Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725-732.
48. Christensen, J. L., and Weissman, I. L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14541-14546.
49. Christodouloupoloulos, I., and Cannon, P. M. (2001). Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J Virol* 75, 4129-4138.
50. Civin, C. I., Almeida-Porada, G., Lee, M. J., Olweus, J., Terstappen, L. W., and Zanjani, E. D. (1996). Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 88, 4102-4109.
51. Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
52. Cohn, M. A., and D'Andrea, A. D. (2008). Chromatin recruitment of DNA repair proteins: lessons from the fanconi anemia and double-strand break repair pathways. *Mol Cell* 32, 306-312.
53. Coutelle, C., Douar, A. M., Colledge, W. H., and Froster, U. (1995). The challenge of fetal gene therapy. *Nat Med* 1, 864-866.
54. Cowan, M. J., and Golbus, M. (1994). In utero hematopoietic stem cell transplants for inherited diseases. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 16, 35-42.
55. D'Andrea, A. D., and Grompe, M. (1997). Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. *Blood* 90, 1725-1736.
56. Dejneka, N. S., Surace, E. M., Aleman, T. S., Cideciyan, A. V., Lyubarsky, A., Savchenko, A., Redmond, T. M., Tang, W., Wei, Z., Rex, T. S., et al. (2004). In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness. *Mol Ther* 9, 182-188.
57. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838-3843.
58. Dieterlen-Lievre, F., Godin, I. E., Garcia-Porrero, J. A., and Marcos, M. A. (1994). Initiation of hemopoiesis in the mouse embryo. *Ann N Y Acad Sci* 718, 140-146.

59. Ditadi, A., de Coppi, P., Picone, O., Gautreau, L., Smati, R., Six, E., Bonhomme, D., Ezine, S., Frydman, R., Cavazzana -Calvo, M., and Andre -Schmutz, I. (2009). Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin- cells display hematopoietic activity
10.1182/blood-2008-10-182105. *Blood*, blood-2008-2010-182105.
60. Diukman, R., and Golbus, M. S. (1992). In utero stem cell therapy. *J Reprod Med* 37, 515-520.
61. Donahue, R. E., and Chen, I. S. (2004). Transgene -specific tolerance versus immune response. *Blood* 104, 1578-1579; author reply 1579.
62. Donahue, R. E., Sorrentino, B. P., Hawley, R. G., An, D. S., Chen, I. S., and Wersto, R. P. (2001). Fibronectin fragment CH -296 inhibits apoptosis and enhances ex vivo gene transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD34+ cells. *Mol Ther* 3, 359-367.
63. Douglas, J., Kelly, P., Evans, J. T., and Garcia, J. V. (1999). Efficient transduction of human lymphocytes and CD34+ cells via human immunodeficiency virus -based gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 10, 935-945.
64. Dzierzak, E., and Speck, N. A. (2008). Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 9, 129-136.
65. Ek, S., Ringden, O., Markling, L., Dahlberg, N., Pschera, H., Seiger, A., Sundstrom, E., and Westgren, M. (1993). Effects of cryopreservation on subsets of fetal liver cells. *Bone Marrow Transplant* 11, 395-398.
66. Escolar, M. L., Poe, M. D., Provenzale, J. M., Richards, K. C., Allison, J., Wood, S., Wenger, D. A., Pietryga, D., Wall, D., Champagne, M., et al. (2005). Transplantation of umbilical -cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *N Engl J Med* 352, 2069-2081.
67. Evans, J. T., Kelly, P. F., O'Neill, E., and Garcia, J. V. (1999). Human cord blood CD34+CD38- cell transduction via lentivirus -based gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 10, 1479-1489.
68. Farson, D., Witt, R., McGuinness, R., Dull, T., Kelly, M., Song, J., Radeke, R., Bukovsky, A., Consiglio, A., and Naldini, L. (2001). A new -generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12, 981-997.
69. Fehling, H. J., Lacaud, G., Kubo, A., Kennedy, M., Robertson, S., Keller, G., and Kouskoff, V. (2003). Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 130, 4217-4227.
70. Ferkowicz, M. J., and Yoder, M. C. (2005). Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Exp Hematol* 33, 1041-1047.
71. Flake, A. W. (2004). In utero stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18, 941-958.
72. Flake, A. W., Harrison, M. R., Adzick, N. S., and Zanjani, E. D. (1986). Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras. *Science* 233, 776-778.
73. Flake, A. W., Roncarolo, M. G., Puck, J. M., Almeida -Porada, G., Evans, M. I., Johnson, M. P., Abella, E. M., Harrison, D. D., and Zanjani, E. D. (1996). Treatment of X-linked severe

combined immunodeficiency by in utero transplantation of paternal bone marrow. *N Engl J Med* 335, 1806-1810.

74. Flake, A. W., and Zanjani, E. D. (1997). In utero hematopoietic stem cell transplantation. A status report. *Jama* 278, 932-937.

75. Flake, A. W., and Zanjani, E. D. (1999). In utero hematopoietic stem cell transplantation: ontogenic opportunities and biologic barriers. *Blood* 94, 2179-2191.

76. Fleischman, R. A., and Mintz, B. (1979). Prevention of genetic anemias in mice by microinjection of normal hematopoietic stem cells into the fetal placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5736-5740.

77. Fleischman, R. A., and Mintz, B. (1984). Development of adult bone marrow stem cells in H-2-compatible and -incompatible mouse fetuses. *J Exp Med* 159, 731-745.

78. Fletcher, J. C., and Richter, G. (1996). Human fetal gene therapy: moral and ethical questions. *Hum Gene Ther* 7, 1605-1614.

79. Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M., and Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25, 217-222.

80. Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C., and Trono, D. (1995). HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* 80, 379-388.

81. Gaspar, H. B., Bjorkegren, E., Parsley, K., Gilmour, K. C., King, D., Sinclair, J., Zhang, F., Giannakopoulos, A., Adams, S., Fairbanks, L. D., et al. (2006). Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther* 14, 505-513.

82. Gaspar, H. B., Parsley, K. L., Howe, S., King, D., Gilmour, K. C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., et al. (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364, 2181-2187.

83. Geiger, H., Sick, S., Bonifer, C., and Muller, A. M. (1998). Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts. *Cell* 93, 1055-1065.

84. Gekas, C., Dieterlen-Lievre, F., Orkin, S. H., and Mikkola, H. K. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 8, 365-375.

85. Giampietro, P. F., Auerbach, A. D., Elias, E. R., Gutman, A., Zellers, N. J., and Davis, J. G. (1998). New recessive syndrome characterized by increased chromosomal breakage and several findings which overlap with Fanconi anemia. *Am J Med Genet* 78, 70-75.

86. Giannoukakis, N., Mi, Z., Gambotto, A., Eramo, A., Ricordi, C., Trucco, M., and Robbins, P. (1999). Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene Ther* 6, 1545-1551.

87. Gil, J., Porta, F., Bartolome, J., Lafranchi, A., Verardi, R., Notarangelo, L. D., Carlo-Stella, C., Rodriguez, R., Rodriguez, J. J., Gurbindo, D., et al. (1999). Immune reconstitution after in utero bone marrow transplantation in a fetus with severe combined immunodeficiency with natural killer cells. *Transplant Proc* 31, 2581.

88. Goodell, M. A., McKinney -Freeman, S., and Camargo, F. D. (2005). Isolation and characterization of side population cells. *Methods Mol Biol* 290, 343-352.
89. Gotheström, C., Johnsson, A. M., Mattsson, J., Papadogiannakis, N., and Westgren , M. (2005). Identification of maternal hematopoietic cells in a 2nd -trimester fetus. *Fetal Diagn Ther* 20, 355-358.
90. Graf, T. (2002). Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 99, 3089-3101.
91. Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973) . Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-539.
92. Gregory, C. J., and Eaves, A. C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51, 527-537.
93. Gregory, L. G., Waddington, S. N., Holder, M. V., Mitrophanous, K. A., Buckley, S. M., Mosley, K. L., Bigger, B. W., Ellard, F. M., Walmsley, L. E., Lawrence, L. , *et al.* (2004). Highly efficient EIAV -mediated in utero gene transfer and expression in the major muscle groups affected by Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther* 11, 1117-1125.
94. Grompe, M., and van de Vrugt, H. (2007). The Fanconi family adds a fraternal twin. *Dev Cell* 12, 661-662.
95. Gubbels, S. P., Woessner, D. W., Mitchell, J. C., Ricci, A. J., and Brigande, J. V. (2008). Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature* 455, 537-541.
96. Guenechea, G., Gan, O. I., Dorrell, C., and Dick, J. E. (2001). Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* 2, 75-82.
97. Guenechea, G., Gan, O. I., Inamitsu, T., Dorrell, C., Pereira, D. S., Kelly, M., Naldini, L., and Dick, J. E. (2000). Transduction of human CD34+ CD38 - bone marrow and cord blood -derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. *Mol Ther* 1, 566-573.
98. Guillot, P. V., Abass, O., Bassett, J. H., Shefelbine, S. J., Bou -Gharios, G., Chan, J., Kurata, H., Williams, G. R., Polak, J., and Fisk, N. M. (2008). Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first -trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. *Blood* 111, 1717-1725.
99. Gupta, D. K., and Eger, E. I., 2nd (2008). Inhaled anesthesia: the original closed -loop drug administration paradigm. *Clin Pharmacol Ther* 84, 15-18.
100. Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., and Mulligan, R. C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394.
101. Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K. , *et al.* (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118, 3132-3142.
102. Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis -Girod, S. , *et al.* (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346, 1185-1193.
103. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana -Calvo, M., and Fischer, A. (2003). A serious

adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-256.

104. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.

105. Haddad, E., Landais, P., Friedrich, W., Gerritsen, B., Cavazzana-Calvo, M., Morgan, G., Bertrand, Y., Fasth, A., Porta, F., Cant, A., *et al.* (1998). Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients. *Blood* 91, 3646-3653.

106. Han, X. D., Lin, C., Chang, J., Sadelain, M., and Kan, Y. W. (2007). Fetal gene therapy of alpha-thalassemia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9007-9011.

107. Hanawa, H., Hematti, P., Keyvanfar, K., Metzger, M. E., Krouse, A., Donahue, R. E., Kepes, S., Gray, J., Dunbar, C. E., Persons, D. A., and Nienhuis, A. W. (2004). Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood* 103, 4062-4069.

108. Hanawa, H., Persons, D. A., and Nienhuis, A. W. (2002). High-level erythroid lineage-directed gene expression using globin gene regulatory elements after lentiviral vector-mediated gene transfer into primitive human and murine hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 13, 2007-2016.

109. Hanenberg, H., Hashino, K., Konishi, H., Hock, R. A., Kato, I., and Williams, D. A. (1997). Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 8, 2193-2206.

110. Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D. A. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 2, 876-882.

111. Harrison, D. E. (1980). Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity. *Blood* 55, 77-81.

112. Harrison, D. E., Jordan, C. T., Zhong, R. K., and Astle, C. M. (1993). Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Exp Hematol* 21, 206-219.

113. Harrison, D. E., Zhong, R. K., Jordan, C. T., Lemischka, I. R., and Astle, C. M. (1997). Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term. *Exp Hematol* 25, 293-297.

114. Harrison, M. R., Slotnick, R. N., Crombleholme, T. M., Golbus, M. S., Tarantal, A. F., and Zanjani, E. D. (1989). In-utero transplantation of fetal liver haemopoietic stem cells in monkeys. *Lancet* 2, 1425-1427.

115. Hayashi, S., Abdulmalik, O., Peranteau, W. H., Ashizuka, S., Campagnoli, C., Chen, Q., Horiuchi, K., Asakura, T., and Flake, A. W. (2003). Mixed chimerism following in utero hematopoietic stem cell transplantation in murine models of hemoglobinopathy. *Exp Hematol* 31, 176-184.

116. Hayashi, S., and Flake, A. W. (2001). In utero hematopoietic stem cell therapy. *Yonsei Med J* 42, 615-629.

117. Hayashi, S., Hsieh, M., Peranteau, W. H., Ashizuka, S., and Flake, A. W. (2004). Complete allogeneic hematopoietic chimerism achieved by in utero hematopoietic cell transplantation and cotransplantation of LLME-treated, MHC-sensitized donor lymphocytes. *Exp Hematol* 32, 290-299.
118. Hayashi, S., Peranteau, W. H., Shaaban, A. F., and Flake, A. W. (2002). Complete allogeneic hematopoietic chimerism achieved by a combined strategy of in utero hematopoietic stem cell transplantation and postnatal donor lymphocyte infusion. *Blood* 100, 804-812.
119. Hayward, A., Ambruso, D., Battaglia, F., Donlon, T., Eddelman, K., Giller, R., Hobbins, J., Hsia, Y. E., Quinones, R., Shpall, E., et al. (1998). Microchimerism and tolerance following intrauterine transplantation and transfusion for alpha-thalassemia-1. *Fetal Diagn Ther* 13, 8-14.
120. Heim, D. A., Hanazono, Y., Giri, N., Wu, T., Childs, R., Sellers, S. E., Muul, L., Agricola, B. A., Metzger, M. E., Donahue, R. E., et al. (2000). Introduction of a xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model. *Mol Ther* 1, 533-544.
121. Herzog, E. L., Chai, L., and Krause, D. S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.
122. Heymer, B. (2002). *Clinical and Diagnostic Pathology of Graft Versus Host Disease*. (Berlin, Springer-Verlag).
123. Heyworth, P. G., Cross, A. R., and Curnutte, J. T. (2003). Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* 15, 578-584.
124. Holzgreve, W. (1997). Will ultrasound-screening and ultrasound-guided procedures be replaced by non-invasive techniques for the diagnosis of fetal chromosome anomalies? *Ultrasound Obstet Gynecol* 9, 217-219.
125. Horn, P. A., Keyser, K. A., Peterson, L. J., Neff, T., Thomasson, B. M., Thompson, J., and Kiem, H. P. (2004). Efficient lentiviral gene transfer to canine repopulating cells using an overnight transduction protocol. *Blood* 103, 3710-3716.
126. Horn, P. A., Topp, M. S., Morris, J. C., Riddell, S. R., and Kiem, H. P. (2002). Highly efficient gene transfer into baboon marrow repopulating cells using GALV-pseudotype oncoretroviral vectors produced by human packaging cells. *Blood* 100, 3960-3967.
127. Howson-Jan, K., Matloub, Y. H., Vallera, D. A., and Blazar, B. R. (1993). In utero engraftment of fully H-2-incompatible versus congenic adult bone marrow transferred into nonanemic or anemic murine fetal recipients. *Transplantation* 56, 709-716.
128. Huber, T. L., Kouskoff, V., Fehling, H. J., Palis, J., and Keller, G. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432, 625-630.
129. Ikuta, K., Kina, T., MacNeil, I., Uchida, N., Peault, B., Chien, Y. H., and Weissman, I. L. (1990). A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* 62, 863-874.
130. Inman, K. E., and Downs, K. M. (2007). The murine allantois: emerging paradigms in development of the mammalian umbilical cord and its relation to the fetus. *Genesis* 45, 237-258.
131. Izembart, A., Aguado, E., Gauthier, O., Aubert, D., Moullier, P., and Ferry, N. (1999). In vivo retrovirus-mediated gene transfer to the liver of dogs results in transient expression and induction of a cytotoxic immune response. *Hum Gene Ther* 10, 2917-2925.

132. Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K., and Goodell, M. A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107, 1395-1402.
133. Jackson, K. A., Mi, T., and Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14482-14486.
134. Jacome, A., Navarro, S., Rí o, P., Yanez, R. M., Gonzalez -Murillo, A., Luz Lozano, M., Lamana, M. L., Sevilla, J., Olive, T., Diaz -Heredia, C., *et al.* (2009). Lentiviral-mediated Genetic Correction of Hematopoietic and Mesenchymal Progenitor Cells From Fanconi Anemia Patients. *Mol Ther*.
135. Jerebtsova, M., Batshaw, M. L., and Ye, X. (2002). Humoral immune response to recombinant adenovirus and adeno-associated virus after in utero administration of viral vectors in mice. *Pediatr Res* 52, 95-104.
136. Johansson, M. K., de Vries, T. J., Schoenmaker, T., Ehinger, M., Brun, A. C., Fasth, A., Karlsson, S., Everts, V., and Richter, J. (2007). Hematopoietic stem cell -targeted neonatal gene therapy reverses lethally progressive osteopetrosis in oc/oc mice. *Blood* 109, 5178-5185.
137. Jones, D. R., Anderson, E. M., Evans, A. A., and Liu, D. T. (1995). Long -term storage of human fetal haematopoietic progenitor cells and their subsequent reconstitution. Implications for in utero transplantation. *Bone Marrow Transplant* 16, 297-301.
138. Jordan, C. T., and Lemischka, I. R. (1990). Clonal and systemic analysis of long -term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 4, 220-232.
139. Jordan, C. T., McKearn, J. P., and Lemischka, I. R. (1990). Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. *Cell* 61, 953-963.
140. Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 17, 314-317.
141. Kafri, T., van Praag, H., O uyang, L., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1999). A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol* 73, 576-584.
142. Kamel-Reid, S., and Dick, J. E. (1988). Engraftment of immune -deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242, 1706-1709.
143. Kang, E., Giri, N., Wu, T., Sellers, S., Kirby, M., Hanazono, Y., Tisdale, J., and Dunbar, C. E. (2001). In vivo persistence of retrovirally transduced murine long -term repopulating cells is not limited by expression of foreign gene products in the fully or minimally myeloablated setting. *Hum Gene Ther* 12, 1663-1672.
144. Kantoff, P. W., Flake, A. W., Eglitis, M. A., Scharf, S., Bond, S., Gilboa, E., Erlich, H., Harrison, M. R., Zanjani, E. D., and Anderson, W. F. (1989). In utero gene transfer and expression: a sheep transplantation model. *Blood* 73, 1066-1073.
145. Kavanaugh, M. P., Miller, D. G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S. L., Kabat, D., and Miller, A. D. (1994). Cell -surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7071-7075.
146. Kavanaugh, M. P., Wang, H., Boyd, C. A., North, R. A., and Kabat, D. (1994). Cell surface receptor for ecotropic host -range mouse retroviruses: a cationic amino acid transporter. *Arch Virol Suppl* 9, 485-494.

147. Kelly, P. F., Radtke, S., von Kalle, C., Balcik, B., Bohn, K., Mueller, R., Schuesler, T., Haren, M., Reeves, L., Cancelas, J. A., *et al.* (2007). Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. *Mol Ther* 15, 211-219.
148. Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.
149. Kim, H. B., Shaaban, A. F., Milner, R., Fichter, C., and Flake, A. W. (1999). In utero bone marrow transplantation induces donor-specific tolerance by a combination of clonal deletion and clonal anergy. *J Pediatr Surg* 34, 726-729; discussion 729-730.
150. Kim, H. B., Shaaban, A. F., Yang, E. Y., Liechty, K. W., and Flake, A. W. (1998). Microchimerism and tolerance after in utero bone marrow transplantation in mice. *J Surg Res* 77, 1-5.
151. Kim, I., Saunders, T. L., and Morrison, S. J. (2007). Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell* 130, 470-483.
152. Kim, I., Yilmaz, O. H., and Morrison, S. J. (2005). CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood* 106, 903-905.
153. Kim, J. W., Closs, E. I., Albritton, L. M., and Cunningham, J. M. (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352, 725-728.
154. Klages, N., Zufferey, R., and Trono, D. (2000). A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther* 2, 170-176.
155. Kohn, D. B., Hershfield, M. S., Carbonaro, D., Shigeoka, A., Brooks, J., Smogorzewska, E. M., Barsky, L. W., Chan, R., Burotto, F., Annett, G., *et al.* (1998). T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 4, 775-780.
156. Kozak, S. L., Siess, D. C., Kavanaugh, M. P., Miller, A. D., and Kabat, D. (1995). The envelope glycoprotein of an amphotropic murine retrovirus binds specifically to the cellular receptor/phosphate transporter of susceptible species. *J Virol* 69, 3433-3440.
157. Krause, D. S. (2002). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 9, 754-758.
158. Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., and May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.
159. Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.
160. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-1234.
161. Lam, A. C., Li, K., Zhang, X. B., Li, C. K., Fok, T. F., Chang, A. M., James, A. E., Tsang, K. S., and Yuen, P. M. (2001). Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. *Transfusion* 41, 1567-1576.
162. Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., *et al.* (1996). Identification of primitive human hematopoietic

cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2, 1329-1337.

163. Laterveer, L., Lindley, I. J., Hamilton, M. S., Willemze, R., and Fibbe, W. E. (1995). Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* 85, 2269-2275.

164. Le Blanc, K. (2003). Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 5, 485-489.

165. Lee, P. W., Cina, R. A., Randolph, M. A., Arellano, R., Goodrich, J., Rowland, H., Huang, C. A., Sachs, D. H., and Kim, H. B. (2005). In utero bone marrow transplantation induces kidney allograft tolerance across a full major histocompatibility complex barrier in Swine. *Transplantation* 79, 1084-1090.

166. Lee, P. W., Cina, R. A., Randolph, M. A., Goodrich, J., Rowland, H., Arellano, R., Kim, H. B., Sachs, D. H., and Huang, C. A. (2005). Stable multilineage chimerism across full MHC barriers without graft-versus-host disease following in utero bone marrow transplantation in pigs. *Exp Hematol* 33, 371-379.

167. Lemieux, M. E., Rebel, V. I., Lansdorp, P. M., and Eaves, C. J. (1995). Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures. *Blood* 86, 1339-1347.

168. Leung, W., Blakemore, K., Jones, R. J., Moser, H. W., Mukherjee, G., Griffin, C. A., Rosenblum-Vos, L. S., and Civin, C. I. (1999). A human-murine chimera model for in utero human hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 5, 1-7.

169. Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K. E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D. A., and Hanenberg, H. (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther* 14, 509-519.

170. Li, K., Chuen, C. K., Lee, S. M., Law, P., Fok, T. F., Ng, P. C., Li, C. K., Wong, D., Merzouk, A., Salari, H., *et al.* (2006). Small peptide analogue of SDF-1 α supports survival of cord blood CD34+ cells in synergy with other cytokines and enhances their ex vivo expansion and engraftment into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells* 24, 55-64.

171. Li, Y., Di Naro, E., Vitucci, A., Zimmermann, B., Holzgreve, W., and Hahn, S. (2005). Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *Jama* 293, 843-849.

172. Linch, D. C., Rodeck, C. H., Nicolaides, K., Jones, H. M., and Brent, L. (1986). Attempted bone-marrow transplantation in a 17-week fetus. *Lancet* 2, 1453.

173. Lindton, B., Markling, L., Ringden, O., Kjaeldgaard, A., Gustafson, O., and Westgren, M. (2000). Mixed lymphocyte culture of human fetal liver cells. *Fetal Diagn Ther* 15, 71-78.

174. Lindton, B., Markling, L., Ringden, O., and Westgren, M. (2003). In vitro studies of the role of CD3+ and CD56+ cells in fetal liver cell alloreactivity. *Transplantation* 76, 204-209.

175. Lipshutz, G. S., Sarkar, R., Flebbe-Rehwaltdt, L., Kazazian, H., and Gaensler, K. M. (1999). Short-term correction of factor VIII deficiency in a murine model of hemophilia A after delivery of adenovirus murine factor VIII in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13324-13329.

176. Liu, J. M., Kim, S., Read, E. J., Futaki, M., Dokal, I., Carter, C. S., Leitman, S. F., Pensiero, M., Young, N. S., and Walsh, C. E. (1999). Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther* 10, 2337-2346.
177. Lutzko, C., Omori, F., Abrams -Ogg, A. C., Shull, R., Li, L., Lau, K., Ruedy, C., Nanji, S., Gartley, C., Dobson, H. , *et al.* (1999). Gene therapy for canine alpha -L-iduronidase deficiency : in utero adoptive transfer of genetically corrected hematopoietic progenitors results in engraftment but not amelioration of disease. *Hum Gene Ther* 10, 1521-1532.
178. MacKenzie, T. C., Kobinger, G. P., Kootstra, N. A., Radu, A., Sena -Esteves, M., Bouchard, S., Wilson, J. M., Verma, I. M., and Flake, A. W. (2002). Efficient transduction of liver and muscle after in utero injection of lentiviral vectors with different pseudotypes. *Mol Ther* 6, 349-358.
179. Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M. J ., Dennis, J., Haynesworth, S. E., and Koc, O. N. (2004). Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 33, 597-604.
180. Malech, H. L., Maples, P. B., Whiting-Theobald, N., Linton, G. F., Sekhsaria, S., Vowells, S. J., Li, F., Miller, J. A., DeCarlo, E., Holland, S. M. , *et al.* (1997). Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12133-12138.
181. Martin, G. M., Sprague, C. A., and Epstein, C. J. (1970). Replicative life -span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest* 23, 86-92.
182. Matsunaga, T., Kato, T., Miyazaki, H., and Ogawa, M. (1998). Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long -term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6. *Blood* 92, 452-461.
183. Mayani, H., Guilbert, L. J., and Janowska-Wieczorek, A. (1992). Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 49, 225-233.
184. McAllister, K. A., Bennett, L. M., Houle, C. D., Ward, T., Malphurs, J., Collins, N. K., Cachafeiro, C., Haseman, J., Goulding, E. H., Bunch, D. , *et al.* (2002). Cancer susceptib ility of mice with a homozygous deletion in the COOH-terminal domain of the Brca2 gene. *Cancer Res* 62, 990-994.
185. McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M., and Weissman, I. L. (1988). The SCID -hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241, 1632-1639.
186. McLeod, D. L., Shreve, M. M., and Axelrad, A. A. (1976). Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro. *Nature* 261, 492-494.
187. Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
188. Merianos, D., Heaton, T., and Flake, A. W. (2008). In utero hematopoietic stem cell transplantation: progress toward clinical application. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 729-740.
189. Merianos, D., Tribiad, E., Laje, P., Masayuki, E., Zoltick, P. W., and Flake, A. W. (2008). Evidence for and characterization of the adaptative immune response following in utero hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental hematology* 36, s71.
190. Metcalf, D. (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 339, 27-30.

191. Metcalf, D., MacDonald, H. R., Odartchenko, N., and Sordat, B. (1975). Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1744-1748.
192. Meza, N. W., Alonso -Ferrero, M. E., Navarro, S., Quintana -Bustamante, O., Valeri, A., Garcia-Gomez, M., Bueren, J. A., Bautista, J. M., and Segovia, J. C. (enviado para revisión). Rescue of pyruvate kinase deficiency in mice by gene therapy using the human isoenzyme.
193. Meza, N. W., Quintana -Bustamante, O., Puyet, A., Rio, P., Navarro, S., Diez, A., Bueren, J. A., Bautista, J. M., and Segovia, J. C. (2007). In vitro and in vivo expression of human erythrocyte pyruvate kinase in erythroid cells: a gene therapy approach. *Hum Gene Ther* 18, 502-514.
194. Miller, C. L., and Eaves, C. J. (1997). Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho -myeloid reconstituting ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13648-13653.
195. Miller, D. G., Edwards, R. H., and Miller, A. D. (1994). Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 78-82.
196. Min -Oo, G., Fortin, A., Tam, M. F., Nantel, A., Stevenson, M. M., and Gros, P. (2003). Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nat Genet* 35, 357-362.
197. Mintz, B., Anthony, K., and Litwin, S. (1984). Monoclonal derivation of mouse myeloid and lymphoid lineages from totipotent hematopoietic stem cells experimentally engrafted in fetal hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7835-7839.
198. Mirchandani, K. D., and D'Andrea, A. D. (2006). The Fanconi anemia/BRCA pathway: a coordinator of cross-link repair. *Exp Cell Res* 312, 2647-2653.
199. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72, 8150-8157.
200. Miyoshi, H., Smith, K. A., Mosier, D. E., Verma, I. M., and Torbett, B. E. (1999). Transduction of human CD34+ cells that mediate long -term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283, 682-686.
201. Monni, G., Ibba, R. M., Zoppi, M. A., and Floris, M. (1998). In utero stem cell transplantation. *Croat Med J* 39, 220-223.
202. Moore, M. A., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18, 279-296.
203. Moretti, L., Stramigioli, S., Talevi, N., Bartolucci, M., Marchetti -Rossi, M. T., Polchi, P., Porcellini, A., and Lucarelli, G. (1985). Cryopreservation of human fetal liver: factors influencing granulocyte-macrophage colony (CFU -GM) survival after cryopreservation. *Prog Clin Biol Res* 193, 121-133.
204. Morimoto, M., Kanno, H., Asai, H., Tsujimura, T., Fujii, H., Moriyama, Y., Kasugai, T., Hirono, A., Ohba, Y., Miwa, S., and Kitamura, Y. (1995). Pyruvate kinase deficiency of mice associated with nonspherocytic hemolytic anemia and cure of the anemia by marrow transplantation without host irradiation. *Blood* 86, 4323-4330.
205. Morris, J. C., Conerly, M., Thomasson, B., Storek, J., Riddell, S. R., and Kiem, H. P. (2004). Induction of cytotoxic T -lymphocyte responses to enhanced green and yellow fluorescent proteins after myeloablative conditioning. *Blood* 103, 492-499.

206. Morrison, S. J., and Spradling, A. C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132, 598-611.
207. Morrison, S. J., Uchida, N., and Weissman, I. L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 35-71.
208. Mouchiroud, G., and Blanchet, J. P. (1981). Fetal liver cells produce both fetal and adult erythrocytes in semiallogeneic radiation chimeras: possible influence of adult environment. *Blood* 57, 586-591.
209. Muench, M. O. (2005). In utero transplantation: baby steps towards an effective therapy. *Bone Marrow Transplant* 35, 537-547.
210. Muench, M. O., Rae, J., Barcena, A., Leemhuis, T., Farrell, J., Humeau, L., Maxwell Wiggins, J. R., Capper, J., Mychaliska, G. B., Albanese, C. T., *et al.* (2001). Transplantation of a fetus with paternal Thy-1(+)/CD34(+) cells for chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant* 27, 355-364.
211. Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.
212. Murray, L., Luens, K., Tushinski, R., Jin, L., Burton, M., Chen, J., Forestell, S., and Hill, B. (1999). Optimization of retroviral gene transduction of mobilized primitive hematopoietic progenitors by using thrombopoietin, Flt3, and Kit ligands and RetroNectin culture. *Hum Gene Ther* 10, 1743-1752.
213. Murry, C. E., and Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132, 661-680.
214. Muul, L. M., Tuschong, L. M., Soenen, S. L., Jagadeesh, G. J., Ramsey, W. J., Long, Z., Carter, C. S., Garabedian, E. K., Alleyne, M., Brown, M., *et al.* (2003). Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* 101, 2563-2569.
215. Mychaliska, G. B., Muench, M. O., Rice, H. E., Leavitt, A. D., Cruz, J., and Harrison, M. R. (1998). The biology and ethics of banking fetal liver hematopoietic stem cells for in utero transplantation. *J Pediatr Surg* 33, 394-399.
216. Nakeff, A., and Daniels-McQueen, S. (1976). In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). *Proc Soc Exp Biol Med* 151, 587-590.
217. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
218. Navarro, S., Meza, N. W., Quintana-Bustamante, O., Casado, J. A., Jacome, A., McAllister, K., Puerto, S., Surrallés, J., Segovia, J. C., and Bueren, J. A. (2006). Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther* 14, 525-535.
219. Nelson, J. L., Furst, D. E., Maloney, S., Gooley, T., Evans, P. C., Smith, A., Bean, M. A., Ober, C., and Bianchi, D. W. (1998). Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 351, 559-562.

220. Nygren, J. M., Bryder, D., and Jacobsen, S. E. (2006). Prolonged cell cycle transit is a defining and developmentally conserved hemopoietic stem cell property. *J Immunol* 177, 201-208.
221. Oppenheim, S. M., Muench, M. O., Gutierrez-Adan, A., Moyer, A. L., BonDurant, R. H., Rowe, J. D., and Anderson, G. B. (2001). Hematopoietic stem cell transplantation in utero produces sheep-goat chimeras. *Blood Cells Mol Dis* 27, 296-308.
222. Orkin, S. H., and Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
223. Orlandi, F., Giambona, A., Messana, F., Marino, M., Abate, I., Calzolari, R., Damiani, F., Jakil, C., Renda, M., Dieli, F., et al. (1996). Evidence of induced non-tolerance in HLA-identical twins with hemoglobinopathy after in utero fetal transplantation. *Bone Marrow Transplant* 18, 637-639.
224. Ory, D. S., Neugeboren, B. A., and Mulligan, R. C. (1996). A stable human -derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11400-11406.
225. Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., et al. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12, 401-409.
226. Ottersbach, K., and Dzierzak, E. (2005). The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 8, 377-387.
227. Park, F., Ohashi, K., Chiu, W., Naldini, L., and Kay, M. A. (2000). Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet* 24, 49-52.
228. Pawliuk, R., Eaves, C., and Humphries, R. K. (1996). Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* 88, 2852-2858.
229. Pearce, R. D., Kiehm, D., Armstrong, D. T., Little, P. B., Callahan, J. W., Klunder, L. R., and Clarke, J. T. (1989). Induction of hemopoietic chimerism in the caprine fetus by intraperitoneal injection of fetal liver cells. *Experientia* 45, 307-308.
230. Peranteau, W. H., Endo, M., Adibe, O. O., and Flake, A. W. (2007). Evidence for an immune barrier after in utero hematopoietic-cell transplantation. *Blood* 109, 1331-1333.
231. Peranteau, W. H., Endo, M., Adibe, O. O., Merchant, A., Zoltick, P. W., and Flake, A. W. (2006). CD26 inhibition enhances allogeneic donor -cell homing and engraftment after in utero hematopoietic-cell transplantation. *Blood* 108, 4268-4274.
232. Peranteau, W. H., Hayashi, S., Hsieh, M., Shaaban, A. F., and Flake, A. W. (2002). High-level allogeneic chimerism achieved by prenatal tolerance induction and postnatal nonmyeloablative bone marrow transplantation. *Blood* 100, 2225-2234.
233. Persons, D. A., Allay, E. R., Sabatino, D. E., Kelly, P., Bodine, D. M., and Nienhuis, A. W. (2001). Functional requirements for phenotypic correction of murine beta-thalassemia: implications for human gene therapy. *Blood* 97, 3275-3282.
234. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., and Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.

235. Pirovano, S., Notarangelo, L. D., Malacarne, F., Mazzolari, E., Porta, F., Lanfranchi, A., Giliani, S., Zucca, S., Pecorelli, S., Albertini, A., *et al.* (2004). Reconstitution of T-cell compartment after in utero stem cell transplantation: analysis of T-cell repertoire and thymic output. *Haematologica* 89, 450-461.
236. Ploemacher, R. E., and Brons, R. H. (1989). Separation of CFU-S from primitive cells responsible for reconstitution of the bone marrow hemopoietic stem cell compartment following irradiation: evidence for a pre-CFU-S cell. *Exp Hematol* 17, 263-266.
237. Pluznik, D. H., and Sachs, L. (1965). The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol* 66, 319-324.
238. Porada, C. D., Tran, N., Eglitis, M., Moen, R. C., Troutman, L., Flake, A. W., Zhao, Y., Anderson, W. F., and Zanjani, E. D. (1998). In utero gene therapy: transfer and long-term expression of the bacterial neo(r) gene in sheep after direct injection of retroviral vectors into preimmune fetuses. *Hum Gene Ther* 9, 1571-1585.
239. Porada, C. D., Zanjani, E. D., and Almeida-Porad, G. (2006). Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther* 1, 365-369.
240. Portmann-Lanz, C. B., Schoeberlein, A., Huber, A., Sager, R., Malek, A., Holzgreve, W., and Surbek, D. V. (2006). Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 194, 664-673.
241. Puig, T., Kadar, E., Limon, A., Cancelas, J. A., Eixarch, H., Luquin, L., Garcia, M., and Barquinero, J. (2002). Myeloablation enhances engraftment of transduced murine hematopoietic cells, but does not influence long-term expression of the transgene. *Gene Ther* 9, 1472-1479.
242. Quintana-Bustamante, O., Alvarez-Barrientos, A., Kofman, A. V., Fabregat, I., Bueren, J. A., Theise, N. D., and Segovia, J. C. (2006). Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology* 43, 108-116.
243. Ratajczak, M. Z. (2008). Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* 15, 293-300.
244. Rebel, V. I., Miller, C. L., Eaves, C. J., and Lansdorp, P. M. (1996). The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. *Blood* 87, 3500-3507.
245. Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., *et al.* (2007). Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 39, 162-164.
246. Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R. O., Karlsson, S., and Schubert, M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15266-15271.
247. Relander, T., Johansson, M., Olsson, K., Ikeda, Y., Takeuchi, Y., Collins, M., and Richter, J. (2005). Gene transfer to repopulating human CD34+ cells using amphotropic-, GALV-, or RD114-pseudotyped HIV-1-based vectors from stable producer cells. *Mol Ther* 11, 452-459.
248. Renda, M. C., Fecarotta, E., Dieli, F., Markling, L., Westgren, M., Damiani, G., Jakil, C., Piccotto, F., and Maggio, A. (2000). Evidence of alloreactive T lymphocytes in fetal liver: implications for fetal hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25, 135-141.

249. Richard, R. E., Weinreich, M., Chang, K. H., Ieremia, J., Stevenson, M. M., and Blau, C. A. (2004). Modulating erythrocyte chimerism in a mouse model of pyruvate kinase deficiency. *Blood* 103, 4432-4439.
250. Rio, P., Martinez -Palacio, J., Ramirez, A., Bueren, J. A., and Segovia, J. C. (2005). Efficient engraftment of in utero transplanted mice with retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Gene Ther* 12, 358-363.
251. Rio, P., Meza, N. W., Gonzal ez-Murillo, A., Navarro, S., Alvarez, L., Surralles, J., Castella, M., Guenechea, G., Segovia, J. C., Hanenberg, H., and Bueren, J. A. (2008). In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1. *Blood* 112, 4853-4861.
252. Rio, P., Segovia, J. C., Hanenberg, H., Casado, J. A., Martinez, J., Gottsche, K., Cheng, N. C., Van de Vrugt, H. J., Arwert, F., Joenje, H., and Bueren, J. A. (2002). In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood* 100, 2032-2039.
253. Rosenzweig, M., Connoles, M., Glickman, R., Yue, S. P., Noren, B., DeMaria, M., and Johnson, R. P. (2001). Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells. *Blood* 97, 1951-1959.
254. Rosenzweig, M., MacVittie, T. J., Harper, D., Hempel, D., Glickman, R. L., Johnson, R. P., Farese, A. M., Whiting -Theobald, N., Linton , G. F., Yamasaki, G. , *et al.* (1999). Efficient and durable gene marking of hematopoietic progenitor cells in nonhuman primates after nonablative conditioning. *Blood* 94, 2271-2286.
255. Sanchez, M. J., Holmes, A., Miles, C., and Dzierzak, E. (1996). Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 5, 513-525.
256. Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Negre, D., Le Grand, R., Trono, D., and Cosset, F. L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100, 823-832.
257. Schambach, A., Mueller, D., Galla, M., Verstegen, M. M., Wagemaker, G., Loew, R., Baum, C., and Bohne, J. (2006). Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther* 13, 1524-1533.
258. Schiffmann, R., Medin, J. A., Ward, J. M., Stahl, S., Cottler -Fox, M., and Karlsson, S. (1995). Transfer of the human glucocerebrosidase gene into hematopoietic stem cells of nonablated recipients: successful engraftment and long -term expression of the transgene. *Blood* 86, 1218-1227.
259. Schoeberlein, A., Holzgreve, W., Dudler, L., Hahn, S., and Surbek, D. V. (2004). In utero transplantation of autologous and allogeneic fetal liver stem cells in ovine fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 191, 1030-1036.
260. Shaaban, A. F., Kim, H. B., Milner, R., and Flake, A. W. (1999). A kinetic model for the homing and migration of prenatally transplanted marrow. *Blood* 94, 3251-3257.
261. Shapiro, E., Krivit, W., Lockman, L., Jambaque, I., Peters, C., Cowan, M., Harris, R., Blanche, S., Bordigoni, P., Loes, D. , *et al.* (2000). Long -term effect of bone -marrow

transplantation for childhood -onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet* 356, 713-718.

262. Shields, L. E., Bryant, E. M., Easterling, T. R., and Andrews, R. G. (1995). Fetal liver cell transplantation for the creation of lymphohematopoietic chimerism in fetal baboons. *Am J Obstet Gynecol* 173, 1157-1160.

263. Shields, L. E., Gaur, L., Delio, P., Potter, J., Sieverkropp, A., and Andrews, R. G. (2004). Fetal immune suppression as adjunctive therapy for in utero hematopoietic stem cell transplantation in nonhuman primates. *Stem Cells* 22, 759-769.

264. Shields, L. E., Lindton, B., Andrews, R. G., and Westgren, M. (2002). Fetal hematopoietic stem cell transplantation: a challenge for the twenty -first century . *J Hematother Stem Cell Res* 11, 617-631.

265. Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Schweitzer, I. B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T. V., Greiner, D. L., and et al. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154, 180-191.

266. Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard -Monch, K., Buza -Vidas, N., Adolfsson, J., and Jacobsen, S. E. (2002). Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* 17, 463-472.

267. Sitnicka, E., Lin, N., Priestley, G. V., Fox, N., Broudy, V. C., Wolf, N. S., and Kaushansky, K. (1996). The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87, 4998-5005.

268. Slavin, S., Naparstek, E., Ziegler, M., and Lewin, A. (1992). Clinical application of intrauterine bone marrow transplantation for treatment of genetic diseases --feasibility studies. *Bone Marrow Transplant* 9 Suppl 1, 189-190.

269. Steiner, L. A., and Gallagher, P. G. (2007). Erythrocyte disorders in the perinatal period. *Semin Perinatol* 31, 254-261.

270. Stitz, J., Buchholz, C. J., Engelstadter, M., Uckert, W., Bloemer, U., Schmitt, I., and Cichutek, K. (2000). Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* 273, 16-20.

271. Stripecke, R., Carmen Villacres, M., Skelton, D., Satake, N., Halene, S., and Kohn, D. (1999). Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther* 6, 1305-1312.

272. Surbek, D., Schoeberlein, A., and Wagner, A. (2008). Perinatal stem -cell and gene therapy for hemoglobinopathies. *Semin Fetal Neonat al Med* 13, 282-290.

273. Surbek, D. V., Holzgreve, W., and Nicolaides, K. H. (2001). Haematopoietic stem cell transplantation and gene therapy in the fetus: ready for clinical use? *Hum Reprod Update* 7, 85-91.

274. Surbek, D. V., Young, A., Danzer, E., Schoeberlein, A., Dudler, L., and Holzgreve, W. (2002). Ultrasound-guided stem cell sampling from the early ovine fetus for prenatal ex vivo gene therapy. *Am J Obstet Gynecol* 187, 960-963.

275. Sutton, R. E., Reitsma, M. J., Uchida, N., and Brown, P. O. (1999). Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1 -based vectors is cell cycle dependent. *J Virol* 73, 3649-3660.

276. Sutton, R. E., Wu, H. T., Rigg, R., Bohnlein, E., and Brown, P. O. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. *J Virol* 72, 5781-5788.
277. Suvatte, V., Tanphaichitr, V. S., Visuthisakchai, S., Mahasandana, C., Veerakul, G., Chongkolwatana, V., Chandanayingyong, D., and Issaragrisil, S. (1998). Bone marrow, peripheral blood and cord blood stem cell transplantation in children: ten years' experience at Siriraj Hospital. *Int J Hematol* 68, 411-419.
278. Szilvassy, S. J., Humphries, R. K., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C., and Eaves, C. J. (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8736-8740.
279. Tanphaichitr, V. S., Suvatte, V., Issaragrisil, S., Mahasandana, C., Veerakul, G., Chongkolwatana, V., Waiyawuth, W., and Ideguchi, H. (2000). Successful bone marrow transplantation in a child with red blood cell pyruvate kinase deficiency. *Bone Marrow Transplant* 26, 689-690.
280. Tavassoli, M. (1991). Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells* 17, 269-281; discussion 282-266.
281. Taylor, P. A., McElmurry, R. T., Lees, C. J., Harrison, D. E., and Blazar, B. R. (2002). Allogeneic fetal liver cells have a distinct competitive engraftment advantage over adult bone marrow cells when infused into fetal as compared with adult severe combined immunodeficient recipients. *Blood* 99, 1870-1872.
282. Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E., and Scott, E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.
283. Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M., and Krause, D. S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31, 235-240.
284. Theise, N. D., Krause, D. S., and Sharkis, S. (2003). Comment on "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells". *Science* 299, 1317; author reply 1317.
285. Themis, M., Schneider, H., Kiserud, T., Cook, T., Adebakin, S., Jezard, S., Forbes, S., Hanson, M., Pavirani, A., Rodeck, C., and Coutelle, C. (1999). Successful expression of beta-galactosidase and factor IX transgenes in fetal and neonatal sheep after ultrasound-guided percutaneous adenovirus vector administration into the umbilical vein. *Gene Ther* 6, 1239-1248.
286. Till, J. E., and McCulloch, E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
287. Tisdale, J. F., Hanazono, Y., Sellers, S. E., Agricola, B. A., Metzger, M. E., Donahue, R. E., and Dunbar, C. E. (1998). Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability. *Blood* 92, 1131-1141.
288. Toivanen, P., Uksila, J., Leino, A., Lassila, O., Hirvonen, T., and Ruuskanen, O. (1981). Development of mitogen responding T cells and natural killer cells in the human fetus. *Immunol Rev* 57, 89-105.
289. Touraine, J. L. (1992). Rationale and results of in utero transplants of stem cells in humans. *Bone Marrow Transplant* 10 Suppl 1, 121-126.

290. Touraine, J. L., Raudrant, D., Golfier, F., Rebaud, A., Sembeil, R., Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., D'Oiron, R., Lambert, T., and Gebuhrer, L. (2004). Reappraisal of in utero stem cell transplantation based on long-term results. *Fetal Diagn Ther* 19, 305-312.
291. Touraine, J. L., Raudrant, D., Royo, C., Rebaud, A., Roncarolo, M. G., Souillet, G., Philippe, N., Touraine, F., and Betuel, H. (1989). In -utero transplantation of stem cells in bare lymphocyte syndrome. *Lancet* 1, 1382.
292. Tran, N. D., Porada, C. D., Zhao, Y., Almeida -Porada, G., Anderson, W. F., and Zanjani, E. D. (2000). In utero transfer and expression of exogenous genes in sheep. *Exp Hematol* 28, 17-30.
293. Troeger, C., Surbek, D., Schoberlein, A., Schatt, S., Dudler, L., Hahn, S., and Holzgreve, W. (2006). In utero haematopoietic stem cell transplantation. Experiences in mice, sheep and humans. *Swiss Med Wkly* 136, 498-503.
294. Uchida, N., Sutton, R. E., Frieria, A. M., He, D., Reitsma, M. J., Chang, W. C., Veres, G., Scollay, R., and Weissman, I. L. (1998). HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11939-11944.
295. Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., et al. (2000). Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL -6, and soluble IL -6 receptor. *J Clin Invest* 105, 1013-1021.
296. Ueno, H., and Weissman, I. L. (2006). Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. *Dev Cell* 11, 519-533.
297. Varas, F., Bernard, A., and Bueren, J. A. (1998). Restrictions in the stem cell function of murine bone marrow grafts after ex vivo expansion of short -term repopulating progenitors. *Exp Hematol* 26, 100-109.
298. Vassilopoulos, G., Wang, P. R., and Russell, D. W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901-904.
299. Visser, J. W., Bauman, J. G., Mulder, A. H., Eliason, J. F., and de Leeuw, A. M. (1984). Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *J Exp Med* 159, 1576-1590.
300. Vollweiler, J. L., Zielske, S. P., Reese, J. S., and Gerson, S. L. (2003). Hematopoietic stem cell gene therapy: progress toward therapeutic targets. *Bone Marrow Transplant* 32, 1-7.
301. von Schwedler, U., Kornbluth, R. S., and Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6992-6996.
302. Waddington, S. N., Kramer, M. G., Hernandez -Alcoceba, R., Buckley, S. M., Themis, M., Coutelle, C., and Prieto, J. (2005). In utero gene therapy: current challenges and perspectives. *Mol Ther* 11, 661-676.
303. Waddington, S. N., Mitrophanous, K. A., Ellard, F. M., Buckley, S. M., Nivsarkar, M., Lawrence, L., Cook, H. T., Al -Allaf, F., Bigger, B., Kingsman, S. M., et al. (2003). Long -term transgene expression by administration of a lentivirus -based vector to the fetal circulation of immuno-competent mice. *Gene Ther* 10, 1234-1240.

304. Waddington, S. N., Nivsarkar, M. S., Mistry, A. R., Buckley, S. M., Kemball -Cook, G., Mosley, K. L., Mitrophanous, K., Radcliffe, P., Holder, M. V., Brittan, M., *et al.* (2004). Permanent phenotypic correction of hemophilia B in immunocompetent mice by prenatal gene therapy. *Blood* 104, 2714-2721.
305. Wagers, A. J., Sherwood, R. I., Christensen, J. L., and Weissman, I. L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259.
306. Walsh, C. E., Fu, K., Brecher, M., Kirby, S., Jacobs, P., and Yamada, K. (2001). Retroviral-mediated gene transfer for Fanconi anemia group A patients - a clinical trial. *Blood* 98, 718a.
307. Wang, H., Kavanaugh, M. P., and Kabat, D. (1994). A critical site in the cell surface receptor for ecotropic murine retroviruses required for amino acid transport but not for viral reception. *Virology* 202, 1058-1060.
308. Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2003). Cell fusion is the principal source of bone marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422, 897-901.
309. Wengler, G. S., Lanfranchi, A., Frusca, T., Verardi, R., Neva, A., Brugnani, D., Giliani, S., Fiorini, M., Mella, P., Guandalini, F., *et al.* (1996). In-utero transplantation of parental CD34 haematopoietic progenitor cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency (SCIDX1). *Lancet* 348, 1484-1487.
310. Westgren, M., Bui, T. H., Ek, S., Kublickas, M., Papadogiannakis, N., and Ramel, S. (2003). [Fetal medicine--a new specialty establishing itself in clinical practice. A dream yesterday, a routine today. What do we do tomorrow?]. *Lakartidningen* 100, 850-853.
311. Westgren, M., Ringden, O., Bartmann, P., Bui, T. H., Lindton, B., Mattsson, J., Uzunel, M., Zetterquist, H., and Hansmann, M. (2002). Prenatal T-cell reconstitution after in utero transplantation with fetal liver cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Am J Obstet Gynecol* 187, 475-482.
312. Westgren, M., Ringden, O., Eik-Nes, S., Ek, S., Anvret, M., Brubakk, A. M., Bui, T. H., Giambona, A., Kiserud, T., Kjaeldgaard, A., *et al.* (1996). Lack of evidence of permanent engraftment after in utero fetal stem cell transplantation in congenital hemoglobinopathies. *Transplantation* 61, 1176-1179.
313. Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6, 93-106.
314. Yabe, H., Yabe, M., Hattori, K., Hinohara, T., Morimoto, T., Nakamura, Y., Noma, M., Takei, M., Kobayashi, N., Tsuji, K., and Kato, S. (1996). Successful engraftment of allogeneic CD34-enriched marrow cell transplantation from HLA-mismatched parental donors. *Bone Marrow Transplant* 17, 985-991.
315. Yagi, M., Ritchie, K. A., Sitnicka, E., Storey, C., Roth, G. J., and Bartelmez, S. (1999). Sustained ex vivo expansion of hematopoietic stem cells mediated by thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8126-8131.
316. Yanez, R., Lamana, M. L., Garcia-Castro, J., Colmenero, I., Ramirez, M., and Bueren, J. A. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24, 2582-2591.
317. Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Mansson, R., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S. E. (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3-short-term

hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105, 2717-2723.

318. Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P., and Smith, A. G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.

319. Yonemura, Y., Ku, H., Lyman, S. D., and Ogawa, M. (1997). In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood* 89, 1915-1921.

320. Zanjani, E. D., and Anderson, W. F. (1999). Prospects for in utero human gene therapy. *Science* 285, 2084-2088.

321. Zanjani, E. D., Ascensao, J. L., Flake, A. W., Harrison, M. R., and Tavassoli, M. (1992). The fetus as an optimal donor and recipient of hemopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplant* 10 Suppl 1, 107-114.

322. Zanjani, E. D., Ascensao, J. L., and Tavassoli, M. (1993). Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. *Blood* 81, 399-404.

323. Zanjani, E. D., Flake, A. W., Rice, H., Hedrick, M., and Tavassoli, M. (1994). Long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep. *J Clin Invest* 93, 1051-1055.

324. Zanjani, E. D., Pallavacini, M. G., Ascensao, J. L., Flake, A. W., Harrison, M. R., and Tavassoli, M. (1992). Human-ovine xenogenic transplantation of stem cells in utero. *Bone Marrow Transplant* 9 Suppl 1, 86-89.

325. Zaucha, J. A., Yu, C., Lothrop, C. D., Jr., Nash, R. A., Sale, G., Georges, G., Kiem, H. P., Niemeyer, G. P., Dufresne, M., Cao, Q., and Storb, R. (2001). Severe canine hereditary hemolytic anemia treated by nonmyeloablative marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 7, 14-24.

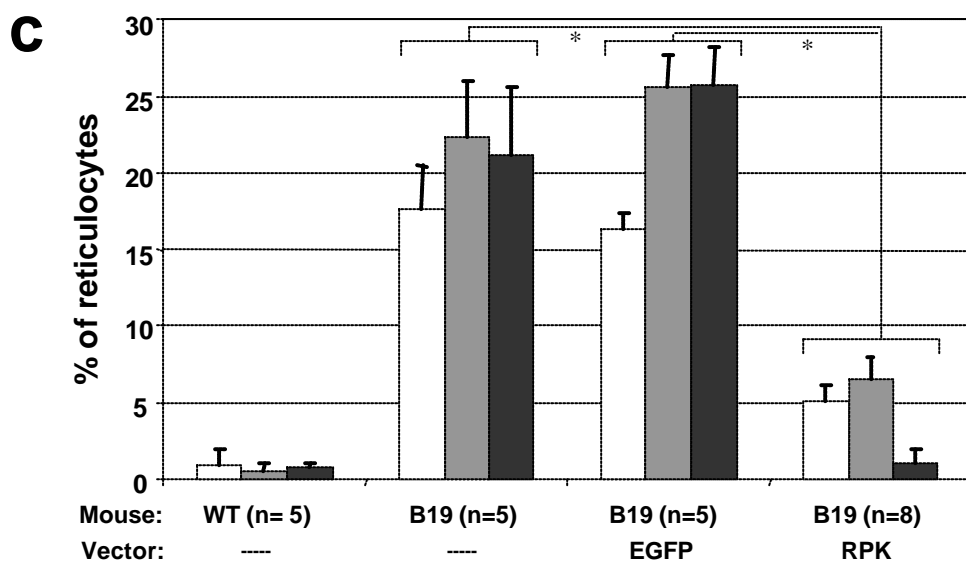
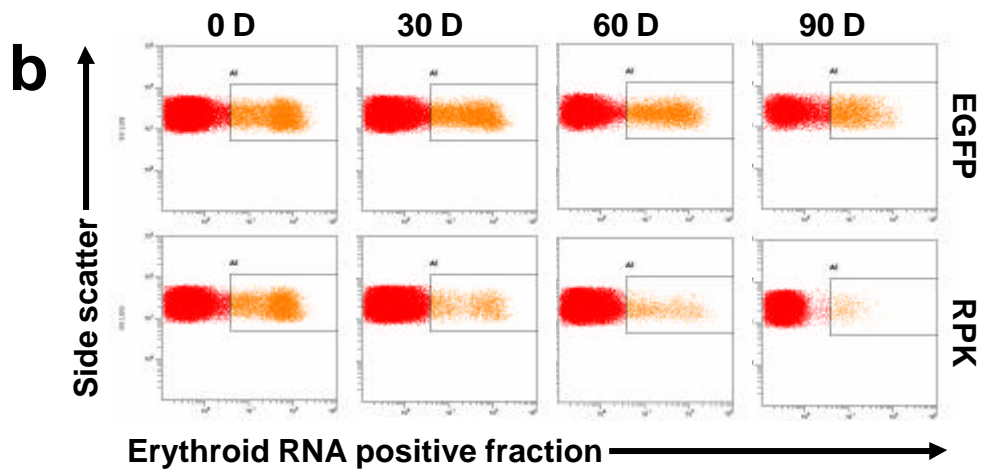
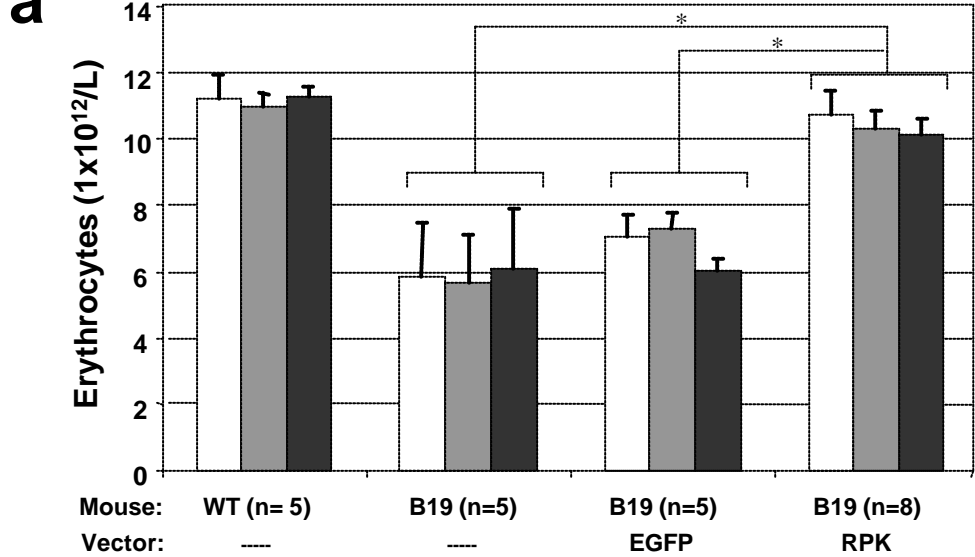
326. Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101, 173-185.

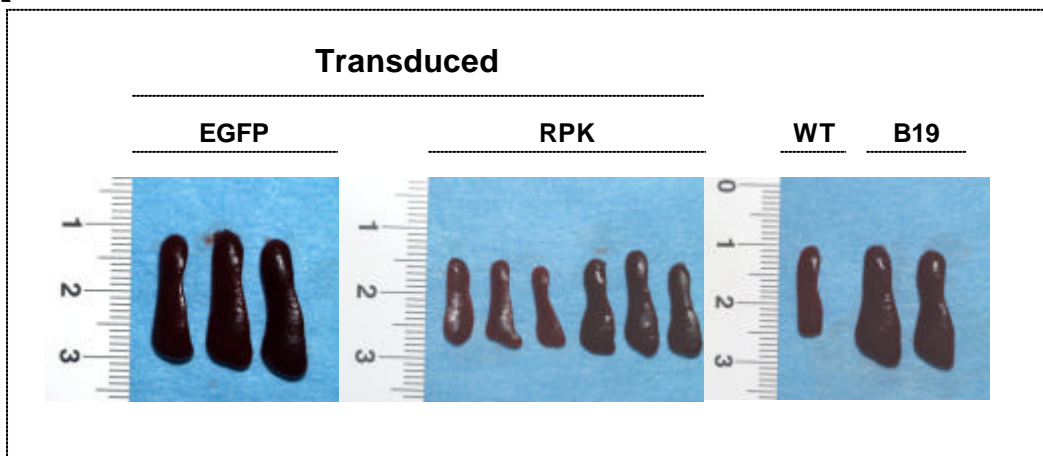
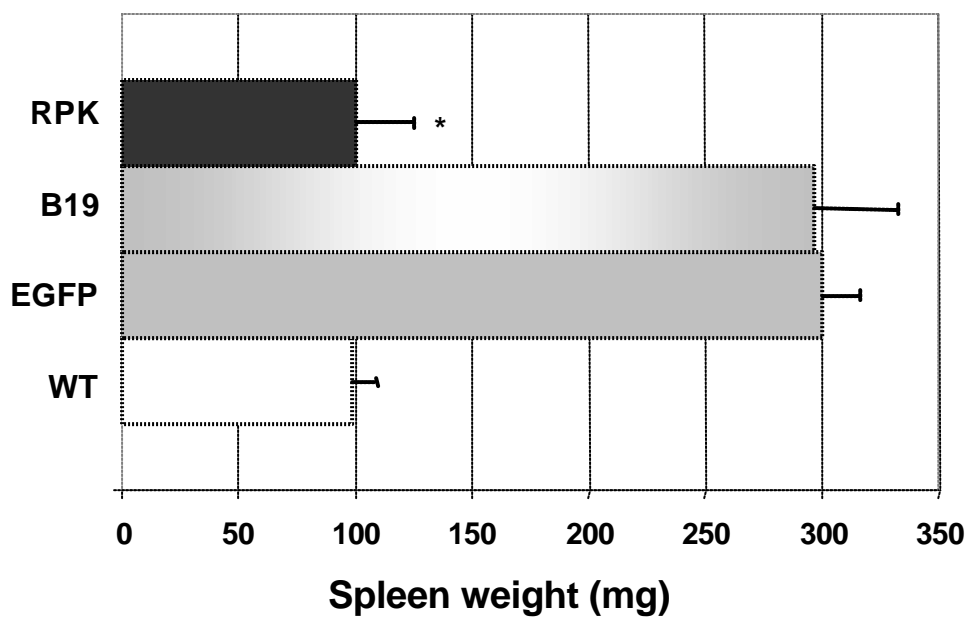
327. Zhao, J., Hao, H. N., Thomas, R. L., and Lyman, W. D. (2001). An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 19, 212-218.

328. Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., and Hope, T. J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73, 2886-2892.

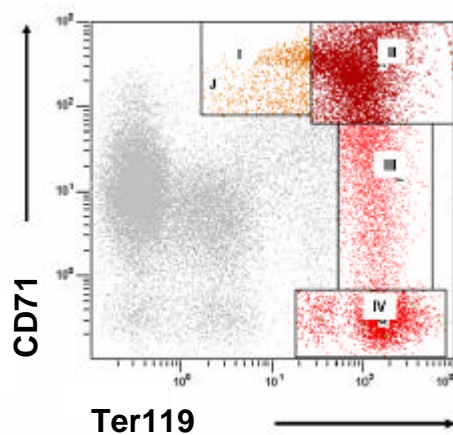
329. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72, 9873-9880.

ANEXO

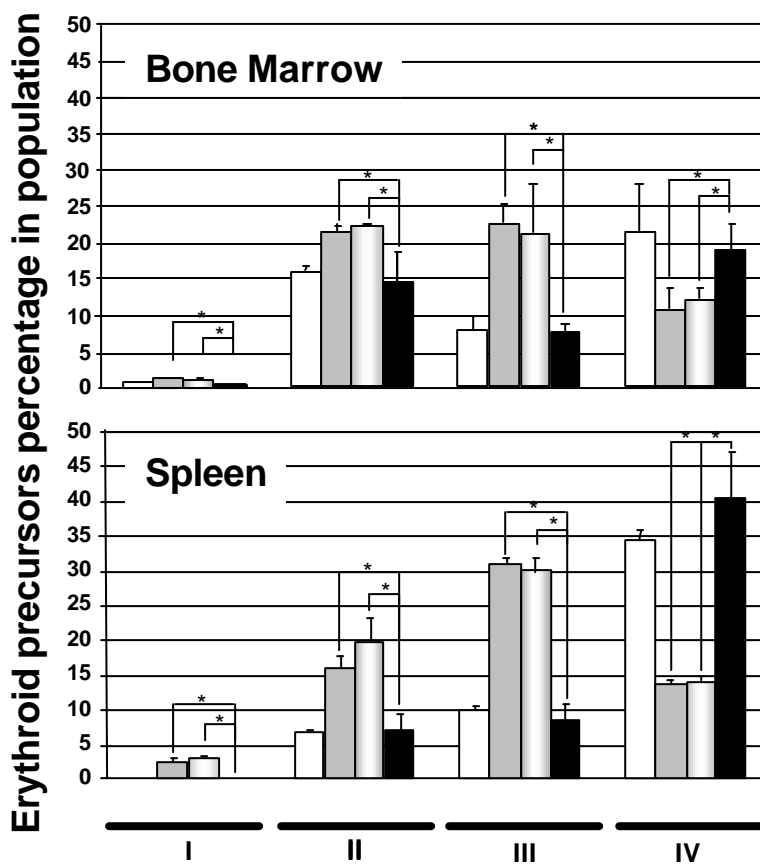


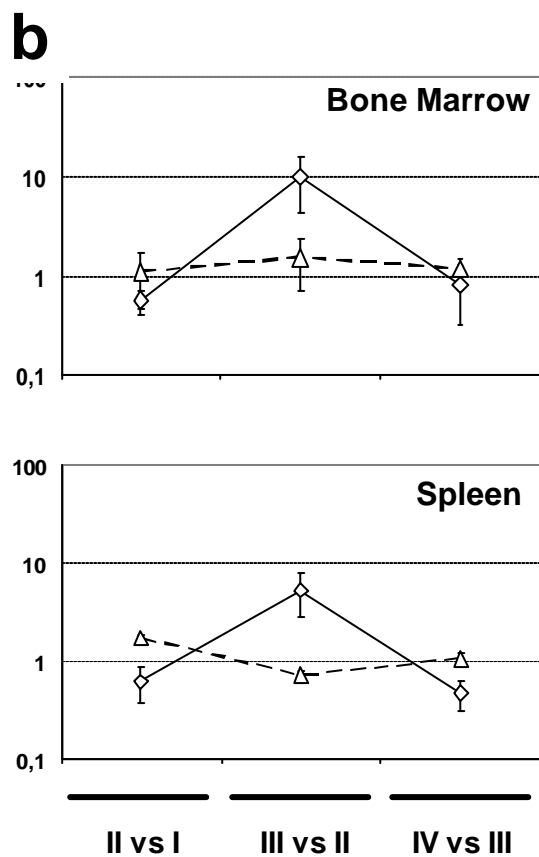
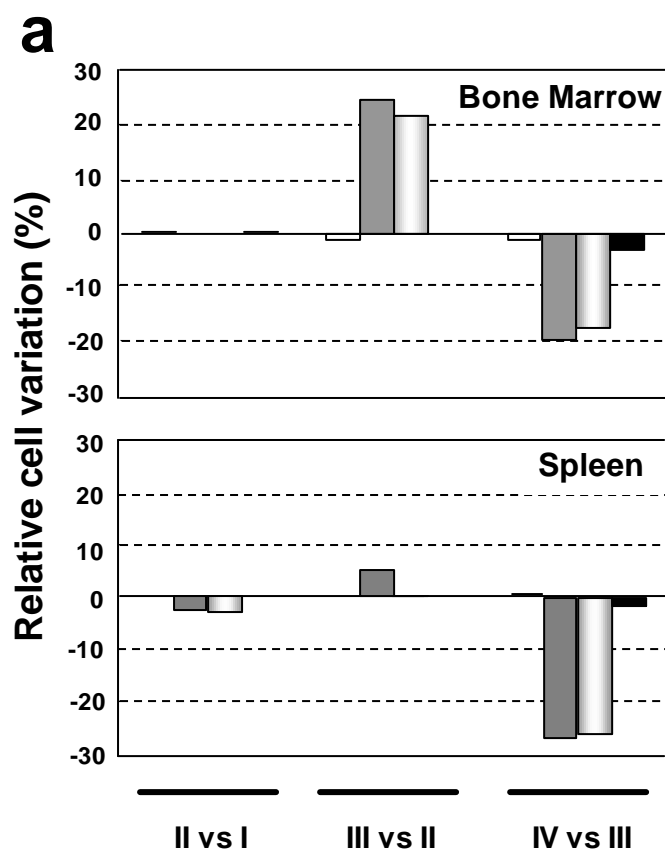
a**b**

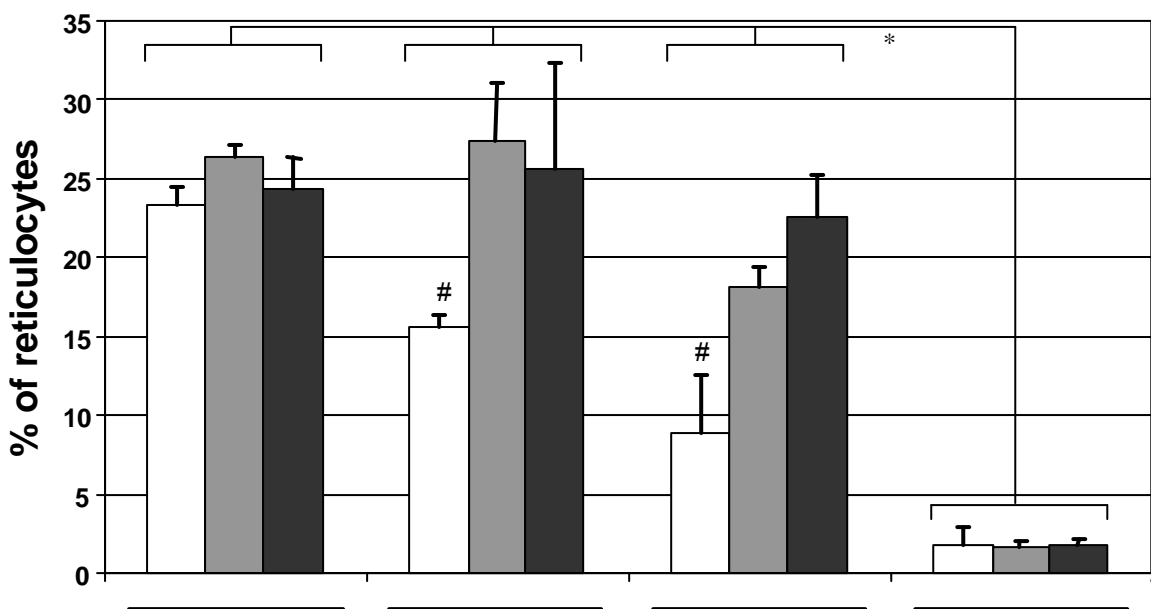
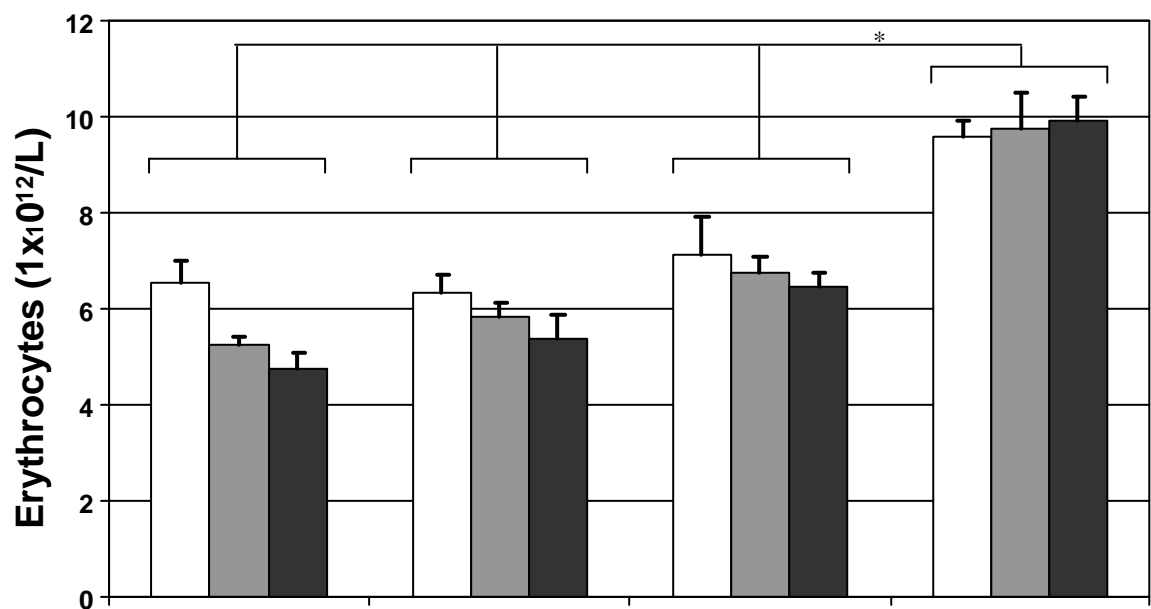
a



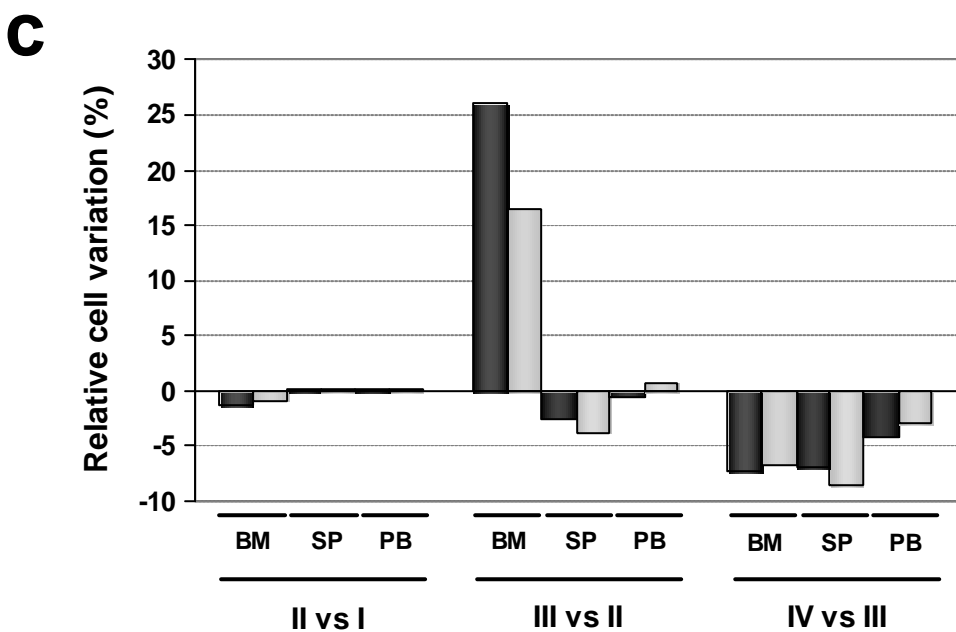
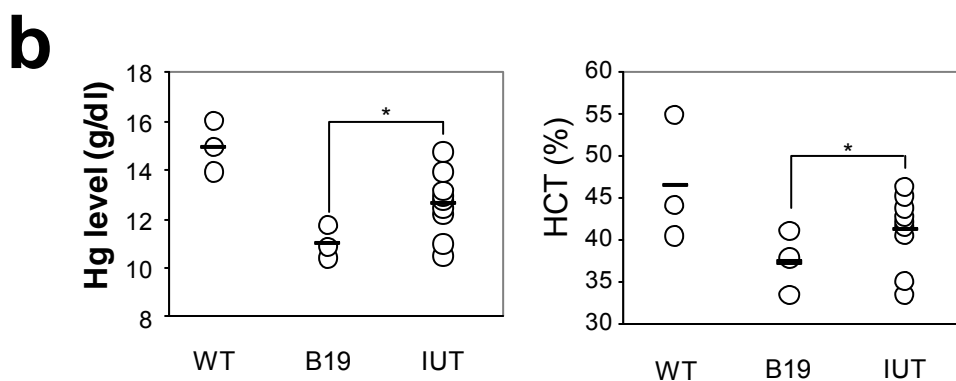
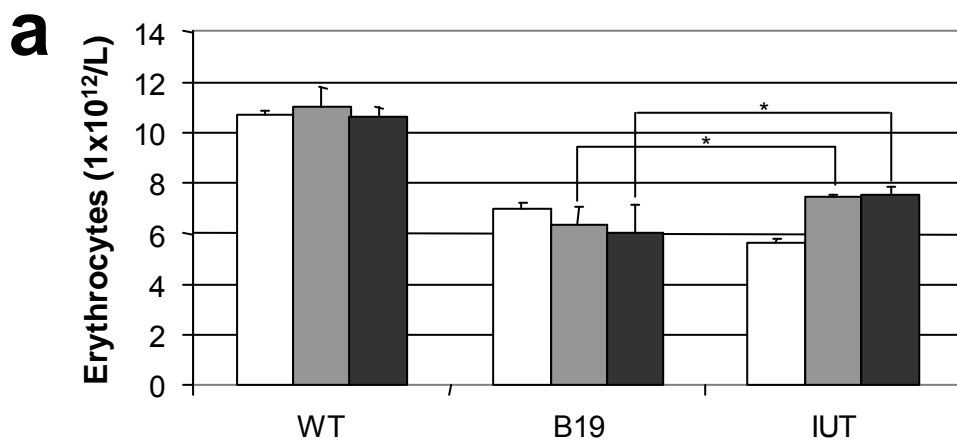
b



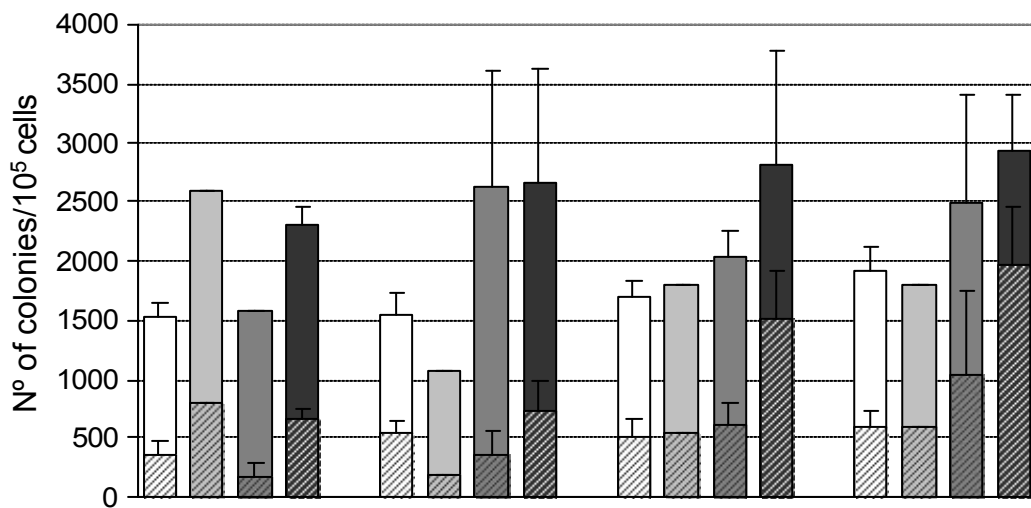




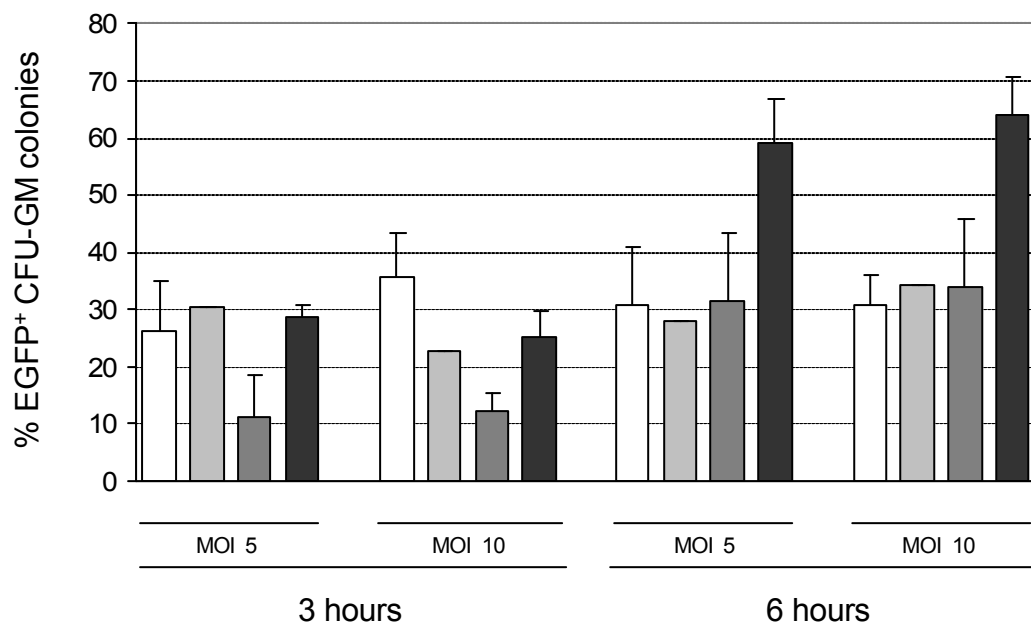
Group:	EGFP (n=3)	RPK 10% (n=3)	RPK 30% (n=3)	RPK 100% (n=7)
Vector:	EGFP	RPK	RPK	RPK
VCN:	6.1 ± 3.4	1.2 ± 0.8	3.7 ± 1.8	11.4 ± 3
% Donor Chimerism:	89 ± 6	13 ± 4	32 ± 8	91 ± 9

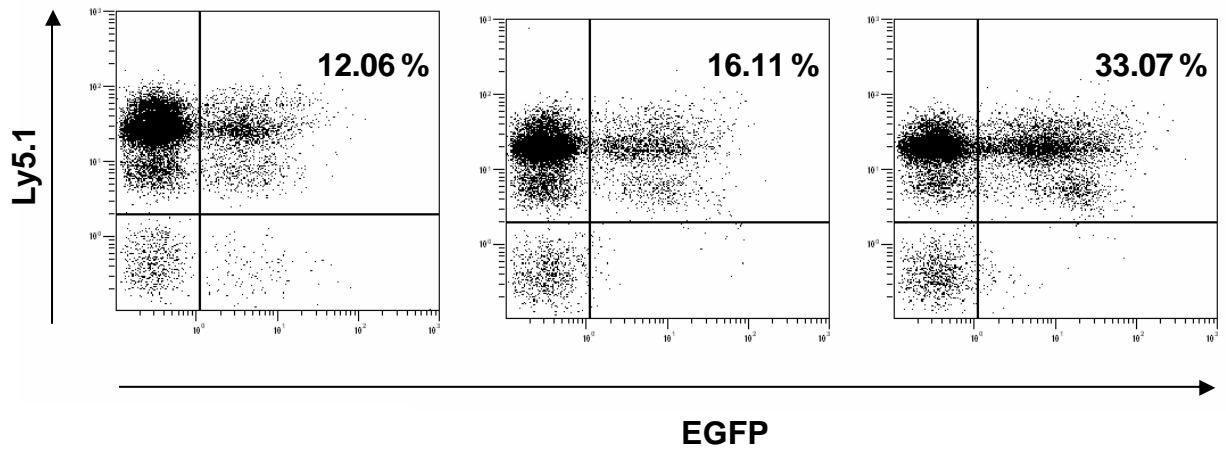
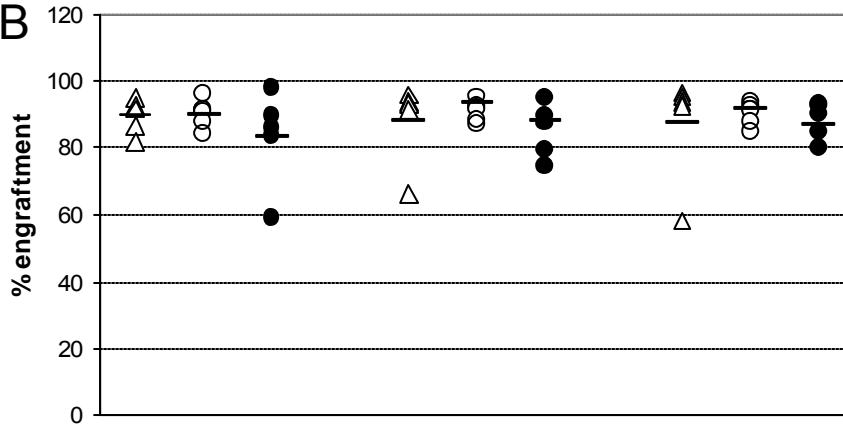
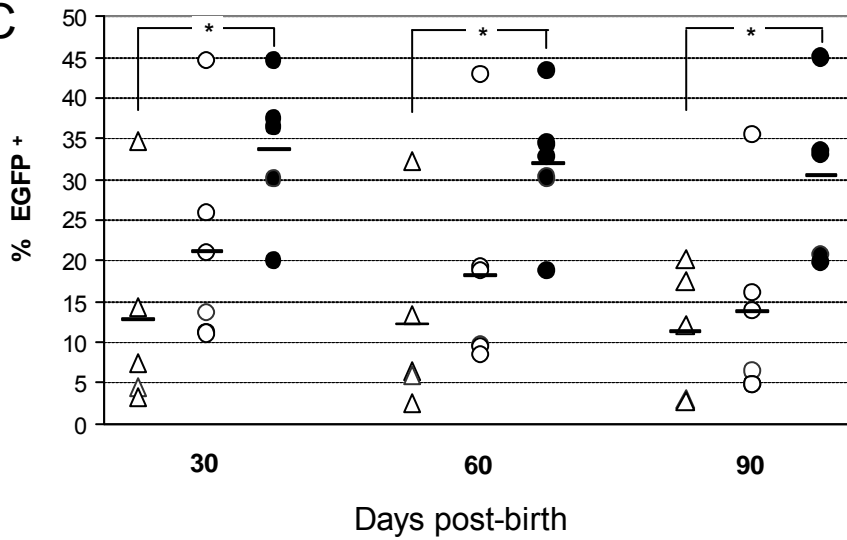


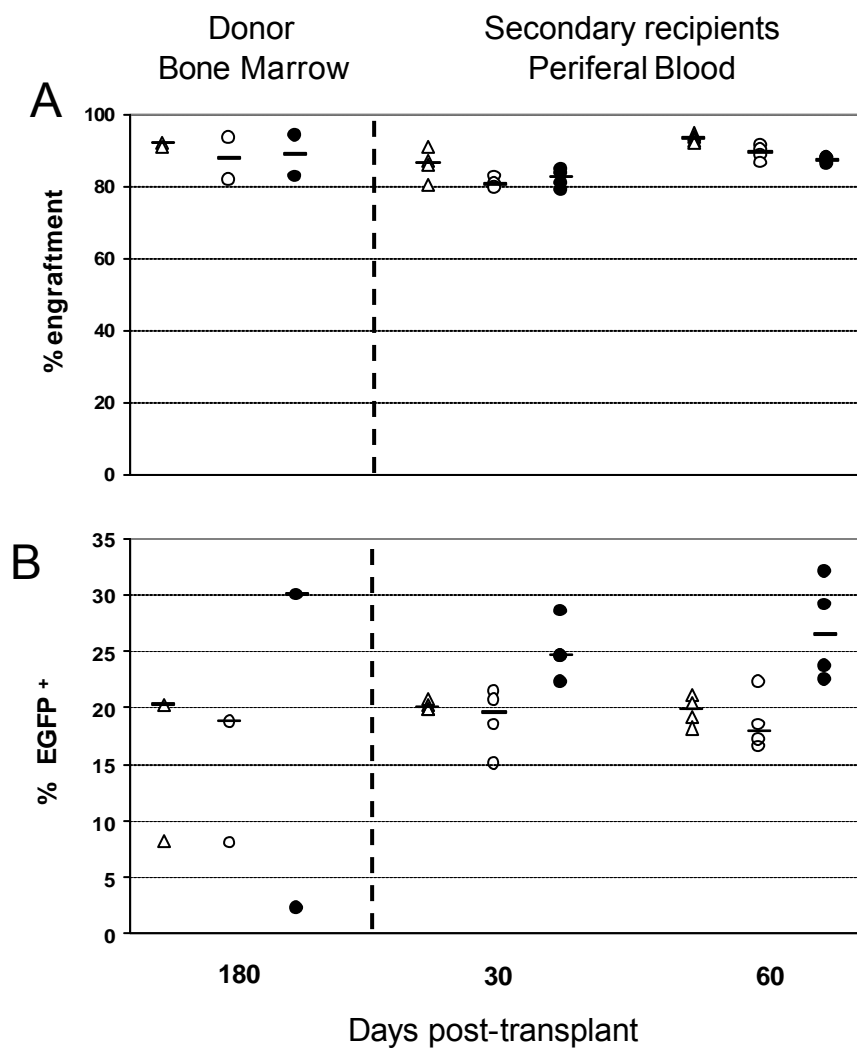
A



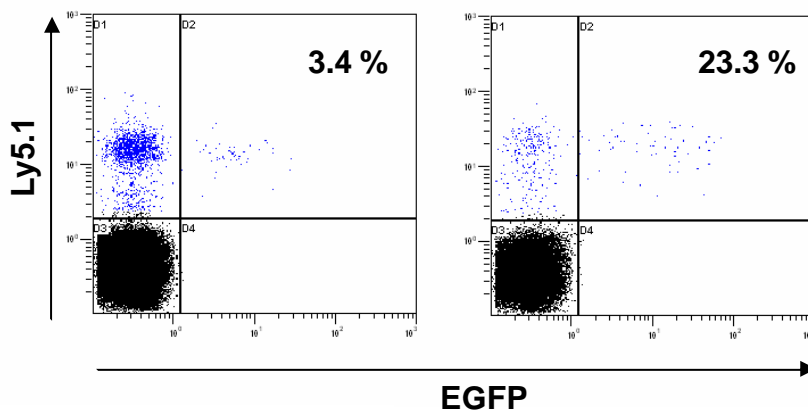
B



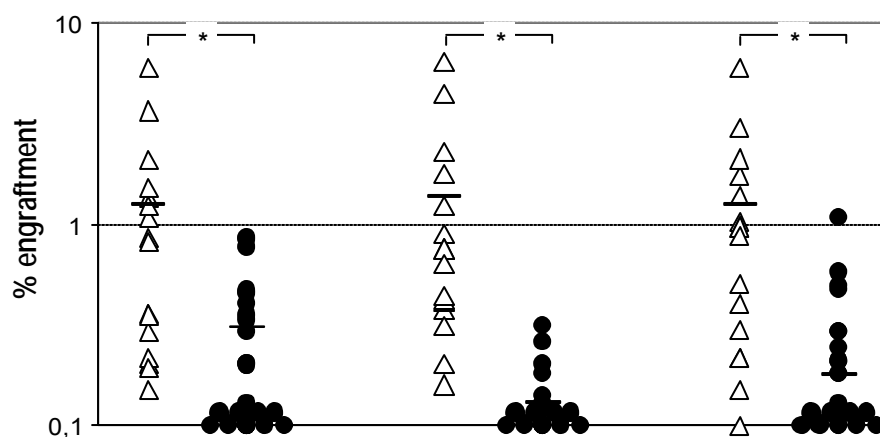
A**B****C**



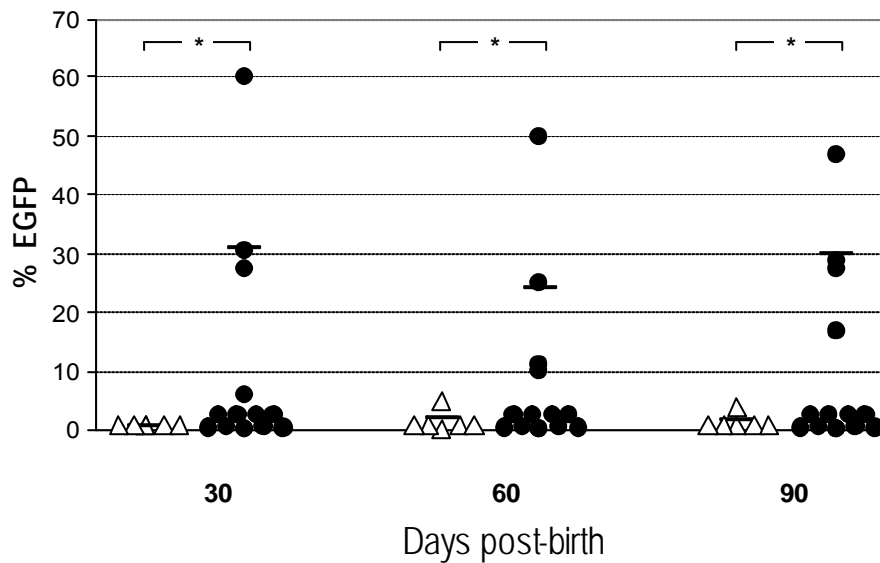
A

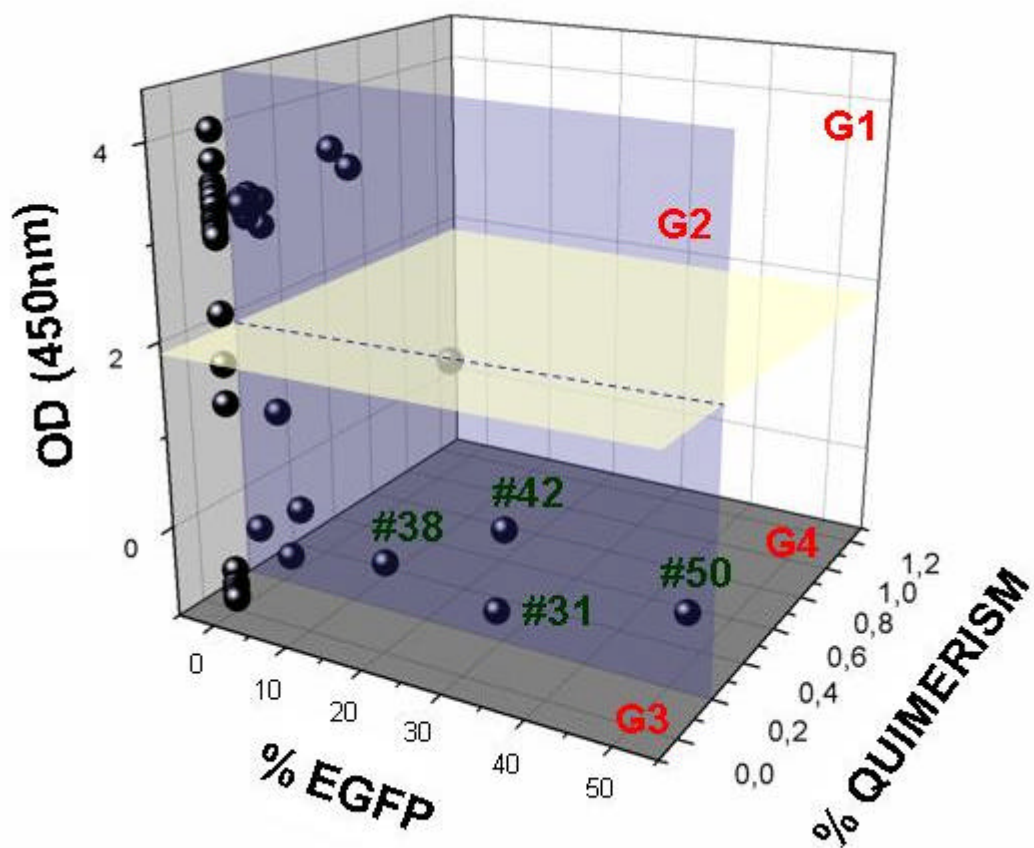


B

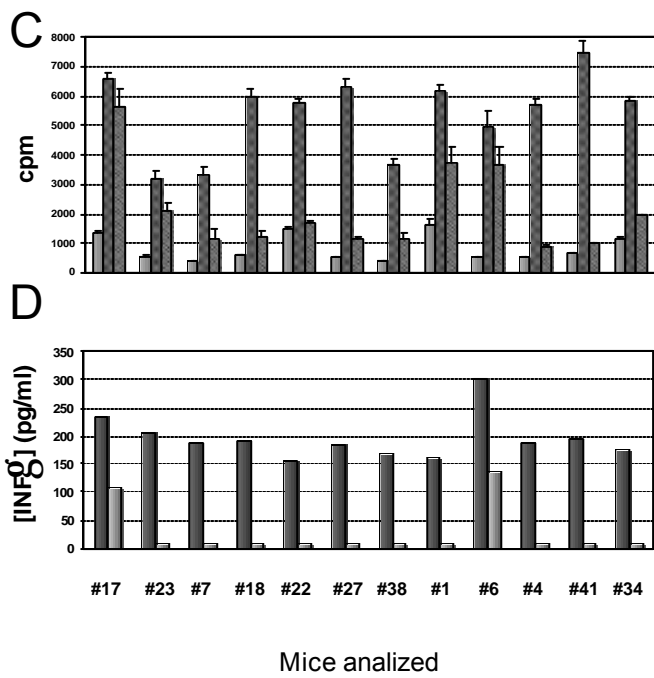
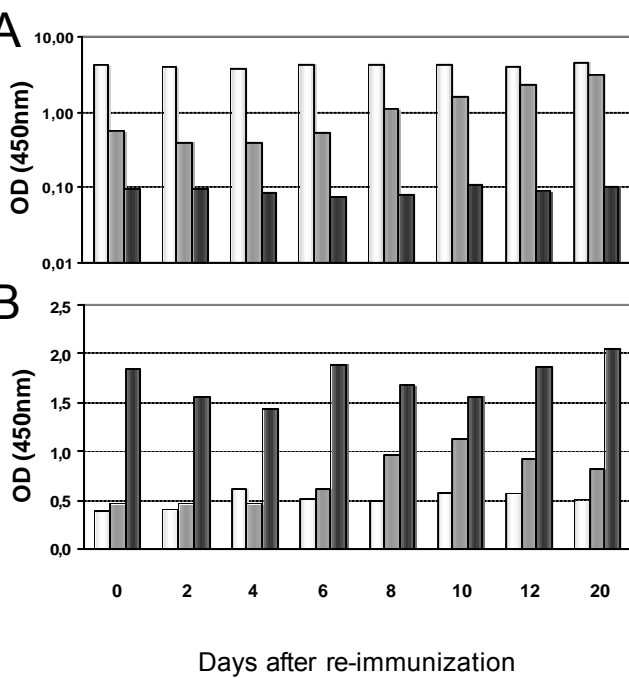


C





M.E. Alonso-Ferrero et al. Figure 5



RESCUE OF PYRUVATE KINASE DEFICIENCY IN MICE BY GENE THERAPY USING THE HUMAN ISOENZYME

N. W. Meza ^{1,2}, M.E. Alonso -Ferrero¹, S. Navarro ¹, O. Quintana -Bustamante^{1,4}, A. Valeri¹, M. Garcia-Gomez¹, J.A. Bueren¹, J.M. Bautista³ and J.C. Segovia¹.

¹Haematopoiesis Division, CIEMAT -CIBERER Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain

² LABIEMET, School of Medicine of Táchira, Universidad de los Andes, San Cristóbal, Venezuela

³Department of Biochemistry and Molecular Biology IV, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

⁴ Haematopoietic Stem cell Laboratory, Cancer Research UK, London, United Kingdom

*Corresponding author: Jose C. Segovia, Haematopoiesis Division, CIEMAT, Av. Complutense 22, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 346 6268 Fax: 34 91 346 6484.
E-mail: jc.segovia@ciemat.es

Running title: Rescue of Pyruvate Kinase Deficiency

Words in the body of the text: 5487

Abstract

Human erythrocyte R-type pyruvate kinase deficiency (PKD) is an autosomic recessive disorder caused by mutations in the *PKLR* gene that produces chronic nonspherocytic haemolytic anaemia. Besides periodic blood transfusion and splenectomy, severe cases require bone marrow transplant, which makes this disease a good candidate for gene therapy. In this study, the normal human RPK cDNA was expressed in haematopoietic stem cells (HSC) derived from *pklr* deficient mice, using a retroviral vector system. These mice show a similar red blood cell phenotype to that observed in human PKD. Transduced HSCs were transplanted into myeloablated adult PKD mice or *in utero* injected into non-conditioned PKD foetuses. In the myeloablated recipients, the haematological manifestations of PKD were completely resolved and normal percentages of late erythroid progenitors, reticulocyte and erythrocyte counts, haemoglobin levels and erythrocyte biochemistry were restored. Corrected cells preserved their rescuing capacity after secondary and tertiary transplant. When corrected cells were *in utero* transplanted, partial correction of the erythrocyte disease was obtained, although a very low number of corrected cells became engrafted, suggesting a different efficiency of cell therapy applied *in utero*. Our data suggest that transduction of hRPK cDNA in *PKLR* mutated haematopoietic stem cells could be an effective treatment strategy in severe cases of human RPK deficiency.

Words in abstract: 207

Introduction

Pyruvate kinase (PK, EC 2.7.1.40) is a metabolic enzyme that catalyses the last step of glycolysis. PK transfers the phosphate group from phosphoenolpyruvate to ADP, generating pyruvate and ATP. Given the critical nature of this reaction, any loss in PK activity impairs cell metabolism [1]. In humans, four PK isoforms are expressed by two structural genes: The *PKLR* gene (pyruvate kinase liver and red blood cells gene) on Chr1q21, encodes the RPK (R-type pyruvate kinase) and LPK (L-type pyruvate kinase) isoforms expressed in erythroid cells and liver, respectively; and the *PKM* gene on Chr15q22 codes for isoforms M1PK (M1 -type pyruvate kinase), expressed in brain and skeletal muscle, and M2PK (M2 -type pyruvate kinase), expressed in foetal and most adult tissues except erythroid cells [2, 3]. The expression of *PKLR*-derived isoenzymes is regulated by tissue specific promoters, while the two products of the *PKM* gene are synthesized by alternative mRNA splicing [2-5].

Mutations in the *PKLR* gene [1, 5-8] lead to pyruvate kinase deficiency (PKD), an autosomal recessive disorder, which is the most frequently occurring enzyme defect of the Embden -Meyerhof pathway in erythrocytes. Together with glucose -6-phosphate dehydrogenase deficiency, this is the most common hereditary enzymopathy causing chronic nonspherocytic haemolytic anaemia (CNSHA) [6, 9]. Over 100 different mutations have been identified in the structural *PKLR* gene [10]. Most are missense mutations, although nonsense mutations, deletions, insertions and even disruption of the erythroid promoter causing severe deficiency have also been reported [10-15]. Generally, most patients are compound heterozygous with

two different mutant alleles, but homozygotes with highly deleterious alleles causing life-threatening anaemia have also been described [10, 15, 16].

Although the global incidence of PKD is unknown, it has been estimated at 51 cases per million in North America [16, 17]. Clinical symptoms of PKD vary considerably from mild to severe anaemia. Pathological manifestations are usually observed when enzyme activity falls below 25% normal PK activity, and severe disease has been associated with a high degree of reticulocytosis [15, 18]. Currently, there is no definitive treatment for severe PKD (see reviews [19-21]) since the *PKLR* gene is not functionally compensated in the erythrocyte by *PKM* isoenzymes [15]. Splenectomy can be clinically useful in patients with severe disease, and in some cases, allogeneic haematopoietic transplantation is required [22, 23]. In these patients, haematopoietic stem cell gene therapy could be a good and more effective treatment.

Animal models of PKD have been developed in dogs and mice [20, 24, 25]. In a dog model, BM transplant without previous recipient conditioning failed to resolve haematological symptoms [20]. In mice, attempts have been made to selectively expand normal donor erythrocytes in minimally conditioned recipients [19]. Attempts to rescue RPK-deficient mice have been addressed using mouse transgenic cells expressing the hRPK cDNA [26]. Human LPK has also been expressed into murine hematopoietic stem cells demonstrating long term expression (3 months) of the hLPK protein in peripheral blood [27]. Recently we reported that transduction of BM cells using gammaretroviral vectors [28, 29] carrying human RPK (hRPK) cDNA [30, 31] mediates the long term expression of the hRPK protein in red blood cells

obtained from primary and secondary recipients, with no detectable adverse effects [32].

Additionally, since PKD is an inherited disease that can be diagnosed before birth [33, 34], the *in utero* transplant of genetically corrected haematopoietic stem cell could be a treatment option, as proposed for other inherited diseases [35, 36]. We recently demonstrated in a mouse model, that genetically modified syngenic haematopoietic cells show efficient engraftment *in utero* and give rise to mature haematopoietic cells in adulthood [37], thus providing phenotype correction from early development to adulthood. This approach avoids the problems associated to allogeneic transplantation, such as the need of a compatible donor and graft rejection.

Here, we show that hRPK expressing vectors are able to fully reverse the haemolytic phenotype in PKD mice. HSCs from these animals can be genetically corrected and transplanted into adult immunoablated PKD mice. In addition, our data indicate that the *in utero* transplant of these genetically corrected cells into non-conditioned PKD fetuses achieves partial correction of the disease.

Materials and Methods

Animals. AcB55 (C57Bl/6 x A/J) mice (also recorded as B19 mice) carrying a point mutation at nucleotide 269 (T → A) of the *pklr* gene [24] were obtained from Emerillon Therapeutics Inc. (Montreal, Quebec, CANADA) and bred at the animal house of the CIEMAT (Registration number 28079-21A). Animals were allowed food and water *ad libitum*, and were routinely screened for pathogens in accordance with FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) procedures. All experimental procedures were conducted according to Spanish and European legislation (Spanish RD 223/88 and OM 13 -10-89 of the Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, for the protection and use of animals in scientific research; and European convention ETS -123, for the use and protection of vertebrate mammals used for experiments or other scientific purposes). Eight to ten week-old B19 mice were used as bone marrow (BM) cell donors and recipients.

Vectors and cell lines. The SF11XEG vector, expressing the enhanced green fluorescent protein (EGFP), and SF11RPKXEG vector, expressing the hRPK and the EGFP proteins in a single mRNA transcript containing an IRES sequence between both cDNAs, vectors used here are modifications of pSF11 γ (GenBank accession no. AJ132035) as described previously [32]. These vectors contain the 3' LTR of spleen focus -forming virus (SFFVp) and the leader sequence of murine embryonic stem cell virus (MESV) [38]. Phoenix 293T cell -based ecotropic packaging cells (Phoenix-eco; kindly provided by Dr Nolan, Stanford University, CA, USA) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Intergen, Purchase, NY, USA).

Viral supernatant production and cell line transduction. To establish ecotropic packaging cells for the SF11XEG and SF11RPKXEG vectors, 20 µg of the corresponding retroviral plasmid DNA were transfected using FuGENE reagent (Roche Diagnosis Corp, Indianapolis, IN, USA) on Phoenix -eco cells following the manufacturer's recommendations. EGFP⁺ cells were sorted in an EPICS ELITE ESP flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) and kept as producer pools.

Purification, transduction and transplant of murine haematopoietic stem cells.

Bone marrow was harvested from 8 to 10 weeks old B19 male mice and subjected to red blood cell lysis. Lineage negative (Lin⁻) progenitors were sorted using the lineage negative magnetic sort kit (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. On average, 80-90% pure populations of Lin⁻ were obtained. Transduction of fresh Lin⁻ cells was performed as previously described [32]. Briefly, Lin⁻ cells were cultured in vitro for 48 hours in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Biowhitacker, Walkersville, USA) plus 20% Foetal bovine serum, 100 ng/ml mSCF and 100 ng/ml hIL-11. Cells were then harvested and resuspended in fresh supernatant from retroviral producer cells supplemented with the same growth factors and plated in retronectin (Takara, Shiga, Japan) coated dishes previously loaded with the corresponding retroviral vectors (3 incubations for 30 minutes of freshly supernatants). Hematopoietic cells were cultured for another 48 hours with 12 hour changes of viral supernatant containing factors. Cells harvested 4 h after the last infection cycle were washed twice in PBA (phosphate-buffered saline [PBS] 1x + 0.1% bovine serum albumin [BSA] + 0.02%

NaN₃), and 2x10⁴ haematopoietic cells/mouse were injected into the tail vein of 8 to 12 week-old female B19 mice, previously irradiated with 9.5 Gy in 2 split doses of 4.75 Gy, 24 h apart, using a Philips MG324 X-ray instrument (Philips, Hamburg, Germany) set at 300 kV, 10 mA, and a delivery dose rate of 1.03 Gy/min.

Haematological variables. Anticoagulated blood samples were collected for haematology analysis and to determine PK activity, ATP and erythropoietin. Complete blood counts, haematocrits, haemoglobin contents and red blood cells indices were obtained using an automated blood cell analyser (Abacus Junior vet, CMV Analitica, Spain). PK activity was determined by the lactate dehydrogenase - coupled spectrophotometric assay [39] using the Pyruvate Kinase Deficiency Kit (Greiner diagnostic, Bahlingen, Germany). PK activity was expressed as microkatal per microgram of total protein (μKat/μg protein). Initial rates of activity were measured at all times.

ATP was quantified using a spectrophotometric ATP detection assay system (ATP Hexokinase FS; DiaSys, Holzheim, Germany). This assay is based on the reaction of glucose with ATP catalysed by hexokinase and Mg²⁺ ions. ATP concentration was expressed as micromoles per microgram of total protein (μmol/μg protein).

Plasma erythropoietin concentrations were determined through an enzyme-linked immunosorbent assay to detect mouse erythropoietin using an anti-mouse erythropoietin antibody (Quantikine Mouse Epo Immunoassay; R&D Systems, Minneapolis, MN).

Colony-forming unit cell (CFU-C) assays. Bone marrow-derived cells (3×10^4) were seeded on 35 -mm plastic tissue culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) in triplicate in methyl cellulose (MethoCult GF M3534 culture medium, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) containing rmSCF (50 ng/mL), rIL -3 (10 ng/mL), rIL -6 (20 ng/mL), granulocyte -macrophage colony -stimulating factor (rmGM-CSF; 0.01 ng/mL), and erythropoietin (rmEpo; 3 U/mL). Cultures were incubated at 37°C in a 95% humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. Seven days after plating, overall colony numbers and EGFP⁺ colonies were scored under a light and epifluorescence microscope, respectively.

Flow cytometry and quantitation of cell variation at specific erythroid subpopulation. The transgene expression and variation in the percentage of erythroid precursors in each erythroid development stages was measured as described elsewhere [32, 40, 41]. Briefly, to analyse the most related erythroid precursors obtained from bone marrow and spleen, 1×10^6 cells were stained with biotinylated anti -CD71 murine (Pharmingen, Palo Alto, CA) and TER -119-phycoerythrin (PE) (Pharmingen) antibodies, washed and incubated with streptavidin-tricolor (Caltag, Burlingame, CA). Cells were resuspended in PBA with 2 µg/mL propidium iodide (PI), and analysed. A minimum number of 3×10^5 viable cells were acquired using a EPICS XL flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL).

Quantitation of cell variation at specific subpopulation stage s was calculated following the mathematical development described elsewhere [40]. Percentage of cell gain or loss (CL) in a subpopulation was calculated using the equation: $CL = 1 -$

$$[(P^{exp}_{i+1} \times P^{control}_i) / (P^{exp}_i \times P^{control}_{i+1})] \times 100$$
, where $P^{control}_i$ is the percentage of cells in the initial population in control mice, P^{exp}_i the percentage of cells in the initial population in RPK deficient mice and $P^{control}_{i+1}$ the percentage of cells in the subsequent population in controls. To calculate the relative cell variation (RCV) between two stages the following formula was applied: $RCV = -(CL \times P^{exp}_i / 100)$, where a positive value corresponded to relative cell gain and a negative value corresponded to a relative cell loss. For reticulocyte analysis, 5 μ L total blood was added to 2 mL PBS containing 0.1 μ g/mL of Acridine Orange (Invitrogen, Carlsbad CA), incubated for 30 minutes at room temperature and directly analyzed by flow cytometry. Reticulocytes were identified as RNA positive cells within the erythrocyte population. A total of 10^6 erythrocytes were analyzed.

Chimerism. Chimerism was quantified as described [42] through a Real time qPCR approach using Rotor Gene RG -3000 (Corbett Research Products, Foxboro, MA, USA). Genomic DNA was extracted using the DNAeasy® Tissue Kit (QUIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Primers for the male-specific sequence were as follows: SRY -F: 5' -TGTTTCAGCCCTACAGCCACA-3' and SRY -R: 5' -CCTCTCACCACGGGACCAC and detected with the TaqMan probe SRY -T: 5' -FAM-ACAATTGTCTAGAGAGCATGGAGGGCCA-BHQ1. The murine genomic β -actin sequence was amplified using the primers: β -actin-MF: 5' -ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3' and β -actin-MR: 5' -ACTATGGCCTCAAGGAGTTTTGTCA- 3'; and detected with the TaqMan probe β -actin-T: 5' -TR-AACGAGCGGTTCCGATGCCCT-BHQ2-3'. Real-time qPCR was carried out in a multiplex reaction. For Amplification, 5 μ L of genomic DNA (to 5 ng/ μ L) were mixed with 20 μ L of a PCR master mix consisting of 1 \times TaqMan

universal master mix NoAmpErase® UNG Applied Biosystems (ROCHE, New Jersey, USA), 200 nM of each primer and 200 nM of each probe. The thermal profile was one hold of 10 min at 95°C, and 55 cycles of 20s at 95°C, and 30s at 58°C.

Proviral DNA analysis. To monitor provirus copy numbers, the EGFP sequence from the retroviral engineered vectors was assayed in transduced cells by real-time PCR. Primers and the TaqMan MGB probe were designed with the aid of the Primers Express software program (Applied Biosystems). The specific EGFP detector was composed of the forward primer: F1EGFP 5' GTAAACGGCCACAAGTTCAGC; reverse primer R1EGFP 5' TGGTGCAGATGAACTTCAGGG and the TaqMan MGB probe PEGFP 5' 6'-FAM-CTTGCCGTAGGTGGC-MGB. For cell lines, DNA was isolated from 1×10^6 cultured cells or from 5×10^5 bone marrow cells using the Puregene kit (Promega, Madison, WI, USA). Genomic DNA was resuspended in 200 μ L of TE Buffer (10 mM Tris with 0.1 mM EDTA), incubated at 65°C for 30 min, vortexed, and stored at 4°C. For real-time PCR analysis, 5 μ L of genomic DNA (to 5 ng/ μ L) were mixed with 20 μ L of a PCR master mix consisting of 1 \times TaqMan universal master mix, 200 nM of each primer (F1EGFP/R1EGFP) and 200 nM of the MGB probe (PEGFP). For negative controls, we used 5 μ L of H₂O and 5 μ L of genomic DNA from untransduced cells. All reactions were conducted in triplicate and amplifications were performed as one cycle of 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 30s and 58°C for 30s. The average number of provirus copies per cell was quantified using a standard curve for the retroviral plasmid as described previously [43].

To measure the transduction efficiency in hematopoietic progenitors we followed the protocol for Villella et al [44] with several modifications. Single colonies growing in methylcellulose were harvested and transferred directly into the PCR tubes, containing 50 μ l crude cell lysing buffer (1x PCR buffer, 0.5% NP -40; 0.5% Tween 20; and 0.91 mg/ml proteinase K). Approximately 80 colonies from each sample were collected and labeled. Nontransduced bone marrow and methylcellulose samples obtained from noncolony areas of the plates and samples containing cell lysis buffer alone were analyzed as negative controls. After all colonies were transferred, the tubes were placed in a thermal for 1 h at 60°C followed by 15 min at 95°C. Then, to detect EGFP sequence s from the retroviral engineered vectors, 10 microliters of cell lysate from each sample was then transferred to each corresponding tube previously loaded with 40 μ l per well PCR master mix, consisting of 1 \times TaqMan universal master mix, 200 nM of each primer (F1EGFP/R1EGFP) and 200 nM of the MGB probe (PEGFP). All reactions were conducted in duplicate and amplifications were performed as one cycle of 95°C for 10 min, and 55 cycles of 95°C for 30s and 58°C for 30s. Real time qPCR assay on the murine genomic β -actin sequence using similar thermal profile and primers/probe concentration was done as an internal control for DNA content. Samples that did not contain the β -actin sequence sequence were removed from the analysis.

In utero transplantation. Retrovirally transduced lineage negative progenitors from B19 mice bone marrow were injected in B19 fetuses on gestation day 14.5. Briefly, under isoflurane anaesthesia, the uterine horns were exposed through a midline laparotomy. Under a dissecting microscope, the foetal liver was identified, and each

foetus was injected with 5×10^5 Lin⁻ cells transduced with the human RPK oncoretroviral therapeutic vector in a total volume of 5 μ L using a 100 μ m bevelled - glass micropipette. After this, the uterine horns were returned to the maternal peritoneal cavity, the abdomen closed by two running re-absorbable 5-0 vicryl sutures and each mother injected subcutaneously with 0.15 mg/weight mg of buprenorphine (Buprex[®], Reckitt Benckiser Healthcare, UK) as analgesic. After birth, haematological variables were monitored for up to three months in the surviving offspring.

Statistical analysis. Data are represented as the mean \pm standard deviation of the mean. The significance of differences between groups was determined by using the non-parametric Wilcoxon Mann -Whitney W test. The processing and statistical analysis of the data was performed by using the Statgraphics Plus 5.0 software package (Manugistics, Inc. Rockville, MD).

Results

The anaemic phenotype is corrected in adult RPK-deficient mice by the transplantation of genetically corrected HSCs

To explore the efficacy of gammaretroviral vectors carrying hRPK cDNA to treat PKD mice, lineage negative cells from the BM of B19 male mice were transduced with SF11XEG or SF11RPKXEG vectors (see Materials and Methods). At the end of the transduction protocol, transduced cells (2×10^5 cells/mouse) were transplanted into lethally irradiated female PKD mice. Erythroid variables were determined in peripheral blood at 30-, 60- and 90-days post transplant (dpt), and compared to data obtained in wild type and non-transplanted B19 littermates. A marked improvement in red blood cells was observed in PKD animals transplanted with genetically corrected cells as soon as 30 dpt. This recovery was stable for up to 90 days post transplant and was not observed in the animals transplanted with cells transduced with the control vector (Figure 1a).

High reticulocyte counts, a pathognomonic sign of PKD in patients, also occurs in B19 mice. Through flow cytometry, we observed a steady reduction in reticulocytosis in PKD animals transplanted with genetically corrected cells, but not in PKD animals transplanted with cells transduced with the control vector (Figure 1b). This reduction was observed at 30 days post-transplantation and normal reticulocyte counts were recorded in subsequent analyses (Figures 1b and 1c).

To establish whether gene therapy was capable of restoring other red blood cell variables, haemoglobin, haematocrit, erythrocyte mean corpuscular volume and plasma iron levels were determined at 90 days posttransplant. As shown in Table 1, these variables were restored in PKD mice transplanted with genetically corrected cells. In contrast, in animals transplanted with cells transduced with the control vector the abnormal red cell phenotype was not corrected.

Because of the haemolytic process, PKD patients require constant erythrocyte replenishment and this renders high serum levels of erythropoietin. We examined this factor in control and deficient animals, as well as in animals transplanted with transduced cells. Thus, serum EPO concentrations were up to 10 times higher in deficient animals and deficient animals transplanted with cells transduced with the control vector, compared to normal control littermates (Table 1). In animals transplanted with RPK-corrected cells, however, serum EPO concentration was normal. Splenomegaly, a characteristic sign of PKD, was also examined in PKD mice at 110 days post transplant. Animals were sacrificed and their spleens excised for morphometric analysis. As shown in Figure 2, PKD animals transplanted with genetically corrected cells showed a marked reduction in spleen weight and size. As expected, anaemic mice transplanted with cells transduced with the non-therapeutic vector showed no reduction of splenomegalia.

The phenotypic changes observed were associated to the increase in activity levels of PK enzyme and ATP in erythroid cells (Table 2). In animals genetically corrected, the erythrocyte PK activity rises ~3.5-fold on the mean of enzymatic activity quantified in PKD mice erythroid (~75% of wild type erythrocyte PK activity), and the

ATP levels were restored to normal values. Collectively, these data indicate that transgenic expression of the human RPK protein completely resolves the haemolytic anaemia characteristic of this PKD mouse model.

RPK expression in late erythroid precursors is needed to correct erythrocyte maturation and generate normal erythroid cells

Next, we examined differentiation patterns of the erythroid cell lineage in control and genetically corrected PKD animals. Spleen and BM cells were analyzed for the expression of TER119 and CD71 antigens by flow cytometry. Four erythroid subpopulations: I, early proerythroblasts ($\text{Ter119}^{\text{med}}\text{CD71}^{\text{high}}$); II, basophilic erythroblasts ($\text{Ter119}^{\text{high}}\text{CD71}^{\text{high}}$); III, late basophilic and polychromatophilic erythroblasts ($\text{Ter119}^{\text{high}}\text{CD71}^{\text{med}}$); and IV, orthochromatophilic erythroblasts and mature erythroid cells ($\text{Ter119}^{\text{high}}\text{CD71}^{\text{low}}$) could be identified as previously described [32] (Figure 3a). In spleen and bone marrow from PKD mice, a predominance of immature erythroid precursor cells was indicated by expanded populations of proerythroblasts, basophilic erythroblasts and polychromatophilic erythroblasts in comparison with proportions recorded in wild type animals (Figure 3b). As expected, late erythroid populations were significantly lower in PKD mice. The different erythroid subpopulations in bone marrow and spleen were established to normal ranges in animals transplanted with genetically corrected cells but not in those transplanted with cells transduced with the control vector (Figure 3b).

To identify at which erythropoiesis stage anomalies occur in this PKD mouse model and whether altered dynamics of erythroid precursor maturation could be rescued by RPK gene therapy, maturation dynamics of late erythroid precursors were studied in BM and spleen (Figure 4). Maturation dynamics were monitored by determining variations in the percentage of precursors corresponding to two consecutive development stages (RCV), as previously reported [32, 40] and also detailed in Material and Methods. In the BM and spleen of PKD mice, relative increases of 22% and 3%, respectively, were observed from the basophilic to polychromatophilic erythroblasts and a similar relative cell loss between the polychromatophilic and the orthochromatophilic erythroblasts was estimated. Overall, in this PKD model, the proliferative increase observed from basophilic (II) to polychromatophilic erythroblasts (III), principally in BM, does not offset the cell loss from polychromatophilic (III) to orthochromatophilic erythroblasts (IV), suggesting that the expression of the erythrocyte PK isoenzyme is essential in the two last differentiation steps of the erythrocyte maturation (Figure 4a). Analyzing only the EGFP expressing population in both groups of animals, we observed that the corrected cells are enriched in the progression of cells from step II to step III (Figure 4b), suggesting a differentiation advantage of corrected cells at this step of the erythropoietic differentiation. These findings support the impact of the therapeutic expression of RPK on the final differentiation and survival of the erythroid precursors.

Overexpression of the RPK protein does not affect metabolic variables in non-erythroid cells

Because of the use of a retroviral promoter, high levels of functional human RPK enzyme were expected not only in erythroid cells but also in other haematopoietic lineages. Increased levels of the PK protein could modify the energy production of blood cells expressing the transgenic hRPK. We thus determined PK activity and ATP levels in both erythrocytes and leukocytes in the different groups of animals (Table 2). As expected, erythrocytes from mice transplanted with genetically corrected cells showed normal PK activity and ATP levels. Interestingly, the different groups of animals showed no significant differences in leukocyte PK activity. Similarly, no differences emerged between leukocyte ATP levels in control mice and mice transplanted with corrected cells, indicating that the transgenic expression of hRPK in these cells did not affect the overall balance of the energy production pathway, probably due to fine regulation of this pathway by other key enzymes, intermediary metabolites and redox coenzymes. Moreover, numbers of peripheral blood leukocytes in genetically corrected mice were not affected, as compared with animals transplanted with the control vector (data not shown).

To check whether the transgenic expression of the hRPK could increase overall plasmatic enzyme activity, we also estimated PK levels in serum samples from the different animal groups. Again, normal levels of serum PK were observed, demonstrating the complete recovery of homeostasis and a lack of side effects in leukocytes produced by the increased PK expression (Table2).

Long-term correction of the disease is dependent on the level of chimerism

Secondary transplants were performed to explore the stability and efficacy of phenotypic correction. One-hundred days after primary transplantation, two -million pooled total bone marrow cells from primary corrected recipients were transplanted into secondary RPK-deficient lethally irradiated mice (n=7) and erythroid variables monitored in peripheral blood. A mean of 85% of genetically corrected progenitors, as measure by provirus real time qPCR detection on methyl cellulose colonies, were transferred to each mouse . In these secondary recipients, erythrocyte and reticulocyte counts were normal up to 120 days post-secondary transplant (Figure 5, group RPK100%) In addition , haematological variables remained normal , including PK activity in peripheral blood erythrocytes (Table 3).

To determine the minimum number of corrected cells needed to achieve a therapeutic effect in our model, reduced numbers of corrected cells from primary recipients were transplanted. Grafts of two -million cells containing 10% (~ 8.5 % of genetically corrected cells) and 30% (~25% of genetically corrected cells) of cells from primary recipients and 90% and 70% of deficient cells, respectively, were transplanted into secondary irradiated recipients (3 mice per group) . Shortly after secondary transplant, animals displayed low numbers of peripheral erythrocytes but reduced numbers of reticulocytes (Figure 5). However, at 90 and 120 dpt this discrete reticulocytosis correction was lost (Figure 5 and Table III) suggesting that more than 25% corrected cells are needed to rescue RPK deficient animals from clinical symptoms.

Additionally, when pooled BM from fully -corrected secondary animals was again transplanted into tertiary female PKD animals (n=5) , erythroid variables were fully

restored up to 2 months after transplantation (data not shown). This data further demonstrates the transduction of very primitive haematopoietic stem cells and the stability of transgene expression in the deficient cells. Moreover, no evidence of leukaemia or myelodysplastic syndrome was observed in primary, secondary and tertiary transplanted animals followed by flow cytometry and anatomopathologic studies (data not shown).

***In utero* gene therapy partially rescues anaemia in RPK deficient mice.**

We next tried to determine whether the treatment of this disease as early as possible could provide additional benefits over the improved clinical manifestations of PKD noted in the treated adult animals. To this end 14.5 day-old fetuses from pregnant B19 female mice were transplanted with 5×10^5 genetically corrected BM cells/fetus. Erythroid variables were followed up to 90 days after birth (Figure 6). At 30 days post-birth (dpb), erythrocyte counts were low. However, increased numbers were recorded at 60 dpb and these numbers persisted at 90 dpb (Figure 6a). Consistently, hematocrit and hemoglobin levels showed similar behaviour indicating partial correction of anemia in *in utero* transplanted animals (Figure 6b). Analysis of late erythroid precursor dynamics showed a partial correction in the bone marrow in the *in utero* transplanted animals in comparison with deficient animals of the same age (Figure 6c).

To estimate the engraftment efficiency of corrected cells, we determined the number of proviral insertions in BM by quantitative real time PCR. A mean viral copy number of 0.01 copies/cell was obtained, which corresponds with a 0.8% of transduced cells engrafted according to Poisson's statistics distribution. It is worthy to point out that similar partial corrections were observed in the *in utero* transplanted animals than in

the secondary recipients transplanted with ten-fold higher amounts of corrected primary cells.

Discussion

The treatment of genetic erythroid deficiencies, such as haemoglobinopathies, or metabolic diseases like glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD) by gene therapy has yielded promising results in animal models [45-47]. Herein, we demonstrate that our previously developed retroviral vectors [32] are capable of fully resolving the pathological symptoms of PKD in a mouse model, including anaemia, reticulocytosis and splenomegalia, and of normalizing EPO, PK and ATP levels, without modifying the metabolic energy balance in white blood cells. Moreover, we show that values above 25% of genetically corrected cells are needed to fully rescue the deficiency. The lack of sufficient therapeutic effects observed in adult chimerism and in *in utero* assays discarded a possible proliferative advantage from corrected HSC population. Also, we suggest that the *in utero* transplant of RPK corrected cells could be a therapeutic strategy when foetal anaemia due to PKD is early diagnosed to prevent *hydrops fetalis* due to this disorder [48].

Transplantation of RPK-corrected cells resolved erythroid pathological symptoms as early as 30 dpt, indicating that the normal function of hRPK in corrected erythrocytes is rapidly restored. Splenomegalia, a common sign of haemolytic anaemia, was also reversed in response to our gene therapy protocol, further demonstrating that the exacerbated functionality of this organ is not required after anaemia rescue. As expected, other relevant erythroid variables, including haemoglobin levels, haematocrit, mean corpuscular volume and iron plasma levels, were fully restored in PKD animals transplanted with the therapeutic vector, demonstrating that the expression of hRPK in the mouse erythrocytes completely

rescues this metabolic pathway in the erythroid lineage and allows the generation of normal erythrocytes in peripheral blood. In addition, erythropoietin levels dramatically drop indicating that a normal steady-state of haematopoiesis is attained after gene therapy.

Although the use of retroviral vectors to drive the ubiquitous expression of the hRPK gene could disturb the physiological generation of ATP in white blood cells, ATP levels measured in peripheral blood leukocytes from genetically corrected PKD mice were not increased as a result of the ectopic expression of the hRPK in these cells, indicating a fine regulation of this pathway either by direct ATP inhibition [49] or by metabolic and transcriptional control [50].

In humans, pathological signs of PKD appear when enzyme activity drops below 25% normal levels [5, 7, 51]. A mouse model of PKD has revealed that 10% normal BM renders red blood cells expressing nearly normal RPK protein levels [19]. To estimate the minimal amount of genetically corrected cells needed for rescue therapy, we transplanted 30% and 10% of bone marrow cells harvested from primary recipient animals, with 25% and 8.5% of corrected cells respectively. Although in the short term reticulocytosis was significantly corrected, these reduced proportions of transduced haematopoietic stem cells were unable to solve the haematological defects of PKD mice in the long term. These data indicate that, in our PKD mice model, more than 25% of corrected cells are needed to resolve the haematological symptoms of PKD. Interestingly, a low correction of the phenotype was observed in PKD mice injected *in utero* with a 0.8% of estimated engraftment of transduced cells. These data suggest that the administration of corrected cells at

very early development stages could be therapeutically a more efficient strategy to address the correction of this disease.

In gene therapy for metabolic diseases, the expression of the normal version of the dysfunctional protein could confer the corrected cells an advantage over non-corrected cells. In our system, we observed an increased capacity of basophilic erythroblasts to differentiate into polychromatic erythroblasts, suggesting the dependence of this step on correct RPK expression. Thus, the expression of the hRPK enzyme in deficient erythroid precursors confers a significant differentiation advantage over non-corrected deficient erythroid precursors. However, when reduced numbers of corrected HSC are transplanted as occurred in secondary transplants, or when corrected cells were transplanted *in utero*, the therapeutic effect is lost. These evidences would indicate that the differentiation advantage observed in the genetically corrected erythroid precursors might be insufficient to completely rescue the deficiency in the presence of low numbers of corrected cells. Alternatively, the transfer of reduced numbers of cells could result in the absence of genetically corrected hematopoietic stem cells in the graft that will end in the loss of anemia recovery in the long term.

Attempts to selectively expand normal donor erythrocytes have included the use of chemical inducers of dimerization (CIDs) in minimally conditioned, bone marrow transplanted pyruvate kinase deficient mice, but the proliferative advantage observed in normal erythroid progenitors was found to be dependent on regular CID administration [19]. Thus, RPK transfer protocols will always require a significant extent of donor chimeric haematopoiesis. In our system, high and stable expression

levels of the RPK gene after myeloablative conditioning *in vivo* was achieved, with no deleterious effects observed even after tertiary transplant. The use of autologous genetically corrected cells along with a submyeloablative conditioning protocol to allow significant engraftment of genetically corrected haematopoietic stem cells, as it is undertaken in adenosine deaminase deficient patients [52], would probably be sufficient for successful RPK gene therapy in humans.

Insertional mutagenesis leading to leukaemia has been associated with the transactivation of oncogenes due to insertion of retroviral vectors in the vicinity of the affected genes [53-55]. Although we have not observed adverse effects associated to the gene therapy protocol up to tertiary transplanted animals, improved vectors should be used. Self-inactivated retroviral vectors, either gamma- or lenti-vectors, which have shown lower risks of leukaemogenesis [56-59]. In addition, the obvious benefits of lineage-specific transgene expression determine that the ideal vector for RPK gene therapy would be a self-inactivating lentiviral vector carrying an erythroid-specific promoter [60, 61] or, at least, a weak promoter driving the expression of the hRPK gene [62]. We have recently evaluated the potential use of weak promoters such as the *vav* proto-oncogene, which shows weak and stable protein expression [63]. New lentiviral vectors using this promoter for the treatment of PKD are presently being developed in our laboratory.

In summary, we show here that murine erythroid PKD can be treated by gene therapy with haematopoietic stem cells. Due to its long lasting nature and the fact that it solves all haematological symptoms, this strategy may be an option for the

management of patients with PKD, for whom bone marrow transplant is today the only available therapy.

Acknowledgements

The authors would like to thank E. López, A. de la Cal and M.D. López for their technical assistance, S. García for irradiating the animals and I. Orman for his expert help with the flow cytometry procedures. This work was funded by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2008 -1883; SAF2005-02381; SAF2005-00058), Fondo de Investigaciones Sanitarias (RD06/0010/0015) , the CONSERT European project, private support by the Botin Foundation given to J.C.S and J.A.B., a grant from the Comunidad de Madrid (No. 08.2/0039/2001) awarded to J. M.B. and a grant by the Committee for Scientific, Humanistic, and Technological Development of the University of Los Andes (CDCHT: M-941-08-07-A) given to N.W.M.

Author contribution statement

N. W. Meza: designed research, performed research, contributed vital new reagents or analytical tools, analyzed data, and wrote the paper.

M.E. Alonso-Ferrero: performed research, analyzed data, and wrote the paper.

S. Navarro: performed research

O. Quintana -Bustamante: performed research.

A. Valeri: performed research

M. Garcia-Gomez: performed research

J.A. Bueren: designed research.

J.M. Bautista: designed research.

J.C. Segovia: designed research, analyzed data, and wrote the paper.

Table 1. Haematological variables recorded in retroviral transduced RPK deficient mice

Animals [‡]	Hg level (g/dL)	Hct	MCV (fL)	Plasma Fe level (mg/dL)	Plasma erythropoietin (pg/dL)
WT (n=5) [#]	13.6 ± 0.75	47.8 ± 5.06	45 ± 2.0	251.8 ± 62.5	20.8 ± 10.22
B19 (n=5)	8.7 ± 1.06	33.3 ± 2.51	54 ± 0.70	94.8 ± 6.04	163.7 ± 16.45
EGFP (n=5)	9.1 ± 0.7	32.4 ± 1.89	52.5 ± 1.27	95.3 ± 9.29	144.7 ± 14.48
RPK (n=8)	12.21 ± 0.51*	43.75 ± 2.43*	43.42 ± 1.51*	220.2 ± 65.7*	14.7 ± 14.17*

[‡], WT, wild type, non manipulated mice; B19, PKD non -manipulated mice; EGFP, B19 mice transplanted with cells previously transduced with the EGFP expressing control vector; RPK, B19 mice transplanted with cells previously transduced with the hRPK expressing therapeutic vector. *, statistically significant differences with respect to the B19 and EGFP groups, p<0.05 [#]number of mice analysed

Table 2. Pyruvate kinase activity and ATP levels in genetically corrected RPK deficient mice

Animals	Erythroid PK activity (mkat/mg of protein)	Erythroid ATP level (nmol/mg of protein)	Leukocyte PK activity (mkat/mg of protein)	Leukocyte ATP level (nmol/mg of protein)	Serum PK activity (mkat/L)
WT (n=5) [#]	6.01 x10 ⁻⁴ ± 7.0 x10 ⁻⁵	20.79 ± 2.42	0.028 ± 0.017	16.1 x10 ⁻³ ± 4.6 x10 ⁻³	0.47 ± 0.02
B19 (n=5)	1.29 x10 ⁻⁴ ± 4.7 x10 ⁻⁵	13.89 ± 4.39	0.024 ± 0.004	5.3 x10 ⁻³ ± 2.4 x10 ⁻³	0.24 ± 0.09
EGFP (n=5)	1.16 x10 ⁻⁴ ± 4.1 x10 ⁻⁵	15.77 ± 2.1	0.023 ± 0.007	6.6 x10 ⁻³ ± 3.1 x10 ⁻³	0.27 ± 0.12
RPK (n=8)	4.53 x10 ⁻⁴ ± 1.7 x10 ⁻⁴ *	29.36 ± 8.95 *	0.034 ± 0.012	13.23 x10 ⁻³ ± 6.2 x10 ⁻³ *	0.514 ± 0.21 *

*, statistically significant differences with respect to the B19 and EGFP groups, p<0.05. [#] number of mice analysed

Table 3. Relevant haematological variables recorded in secondary PKD recipients of genetically corrected BM cells obtained from transduced RPK deficient mice

Animals	Hg level (g/dL)	Hct	Erythroid PK activity ((mkat/mg of protein)	Plasma Fe level (mg/dL)	Plasma erythropoietin (pg/dL)
EGFP (n=3)	8.1 ± 0.9	28.9 ± 1.2	1.42 ×10 ⁻⁴ ± 9.0 ×10 ⁻⁵	85.1 ± 12.5	210 ± 35.4
RPK 10%* (n=3) [#]	8.5 ± 0.15	30.1 ± 3.4	1.67 ×10 ⁻⁴ ± 5.2 ×10 ⁻⁵	92.6 ± 7.15	225 ± 28
RPK 30% [#] (n=3)	9.8 ± 0.3	34.9 ± 0.25	1.83 ×10 ⁻⁴ ± 7.2 ×10 ⁻⁵	101.2 ± 8.25	203 ± 19.4
RPK 100% [#] (n=3)	12.5 ± 0.68	45.3 ± 1.38	4.29 ×10 ⁻⁴ ± 8.7 ×10 ⁻⁴	198.6 ± 49.7	21.7 ± 07.17

*, percentage BM cells from treated animals transplanted into secondary recipients together with BM cells from PKD mice. [#]number of mice analysed

Figure legends

Figure 1. Erythrocyte and reticulocyte levels in animals transplanted with transduced cells. (a) Bars corresponds to peripheral blood erythrocyte levels in each group of B19 animals transplanted with EGFP or RPK at 30 (□), 60 (▤), and 90 (■) days post-transplant. Control groups of wild type and B19 littermates were analysed in parallel. In brackets appears the number of animals analysed per group. (b) Representative dot-plot of the analysis used to monitor reticulocytes in peripheral blood. Upper row corresponds to a B19 deficient animal transplanted with cells transduced with the control vector. Lower row corresponds to a B19 mouse transplanted with cells transduced with the therapeutic vector. (c) Reticulocyte percentages recorded in the different groups of animals analysed in a.

Figure 2. Morphometric analysis of spleens from primary recipients. (a) Pictures of spleens for each group of PKD animals transplanted with EGFP or RPK. One spleen from a wild type mouse and two spleens from B19 deficient mice are also shown. (b) Average spleen weights for each group of PKD transplanted mice.

Figure 3. Flow cytometry analysis of erythroid precursor populations in the bone marrow and spleen of animals transplanted with transduced cells. (a) Representative dot plot and analysis of the different erythroid differentiation steps in bone marrow and spleen. Region I: proerythroblasts; Region II: basophilic erythroblasts; Region III: late basophilic and polychromatic erythroblasts; Region IV: orthochromatic erythroblasts and mature erythroid cells. (b) Percentage of each erythroid precursor population in PKD mice transplanted with EGFP or RPK

transduced cells. The bone marrow and spleen of untransduced B19 mice and wild type mice were used as controls. (□), wild-type mice, (■); PKD mice; (▣), deficient mice transplanted with cells transduced with the control vector; (■), deficient mice transplanted with cells transduced with the therapeutic vector. *, $p < 0.01$

Figure 4. Dynamics of erythroid differentiation in the bone marrow and spleen of animals transplanted with transduced cells. (a) Relative cell variation (RCV) between two consecutive erythroid precursor populations is indicated. Steps I to IV are referred to the populations established in figure 3. Positive and negative values indicate an increase or decrease in cellularity between two consecutive differentiation steps. (□), wild-type mice, (■); PKD mice; (▣), deficient mice transplanted with cells transduced with the control vector; (■), deficient mice transplanted with cells transduced with the therapeutic vector. **(b)** Proliferative variation observed between two successive erythroid EGFP⁺ populations in mice transplanted with cells transduced with the control vector (△) or with the therapeutic vector (◇).

Figure 5. Analysis of erythrocyte and reticulocyte levels in secondary recipients. Bars correspond to peripheral blood erythrocyte numbers **(a)**, and percentage reticulocytes **(b)**, for each group of PKD recipients. Three groups with different percentages of primary derived haematopoietic cells (10, 30 and 100%) were evaluated at 30 (□), 60 (▣), and 90 (■) days post-transplant. A control group of wild type non-manipulated littermates was also analyzed. In brackets, the number of animals studied per group is given. VCN, number of integrated viral DNA copies

per cell analysed by Q -PCR. *Statistically significant differences between marked groups, $p < 0.05$. #Statistically significant referred to 60 and 90 days posttransplant.

Figure 6. Partial correction of the erythropoietic phenotype in PKD mice transplanted *in utero* with genetically corrected cells. (a) Bars correspond to the number of peripheral blood erythrocytes detected in wild type, B19 and *in utero* transplanted mice at 30 (□), 60 (▤) and 90 (■) days post-birth. (b) Erythrocyte, haemoglobin and haematocrit values recorded in PKD mice transplanted *in utero* with genetically corrected cells analyzed 90 days post -birth. WT, wild -type mice; B19, PKD mice; IUT, mice *in utero* transplanted with genetically corrected BM cells. (c) Percentage of cell variations between two consecutive erythroid precursor populations in bone marrow (BM), spleen (SP) and peripheral blood (PB) from the same *in utero* transplanted animals. (■) PKD animals; (▤) animals *in utero* transplanted with cells transduced with the therapeutic vector. *Statistically significant differences referred to B19 mice, $p < 0.05$.

References

1. Fothergill-Gilmore, L. A. and Michels, P. A., (1993). Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol.* 59: 105-235
2. Noguchi, T., Yamada, K., Inoue, H., Matsuda, T. and Tanaka, T., (1987). The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *J Biol Chem.* 262: 14366-71
3. Takenaka, M., Noguchi, T., Sadahiro, S., Hirai, H., Yamada, K., Matsuda, T., et al., (1991). Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene. *Eur J Biochem.* 198: 101-6
4. Marie, J., Simon, M. P., Dreyfus, J. C. and Kahn, A., (1981). One gene, but two messenger RNAs encode liver L and red cell L' pyruvate kinase subunits. *Nature.* 292: 70-2
5. Miwa, S., Kanno, H. and Fujii, H., (1993). Concise review: pyruvate kinase deficiency: historical perspective and recent progress of molecular genetics. *Am J Hematol.* 42: 31-5
6. Miwa, S. and Fujii, H., (1990). Pyruvate kinase deficiency. *Clin Biochem.* 23: 155-7
7. Kanno, H., Fujii, H., Tsujino, G. and Miwa, S., (1993). Molecular basis of impaired pyruvate kinase isozyme conversion in erythroid cells: a single amino acid substitution near the active site and decreased mRNA content of the R-type PK. *Biochem Biophys Res Commun.* 192: 46-52

8. Satoh, H., Tani, K., Yoshida, M. C., Sasaki, M., Miwa, S. and Fujii, H., (1988). The human liver-type pyruvate kinase (PKL) gene is on chromosome 1 at band q21. *Cytogenet Cell Genet.* 47: 132-3
9. Tanaka, K. R. and Zerez, C. R., (1990). Red cell enzymopathies of the glycolytic pathway. *Semin Hematol.* 27: 165-85
10. Bianchi, P. and Zanella, A., (2000). Hematologically important mutations: red cell pyruvate kinase (Third update). *Blood Cells Mol Dis.* 26: 47-53
11. Zanella, A. and Bianchi, P., (2000). Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 13: 57-81
12. Lenzner, C., Nurnberg, P., Jacobasch, G., Gerth, C. and Thiele, B. J., (1997). Molecular analysis of 29 pyruvate kinase-deficient patients from central Europe with hereditary hemolytic anemia. *Blood.* 89: 1793-9
13. Kanno, H., Fujii, H., Wei, D. C., Chan, L. C., Hirono, A., Tsukimoto, I., et al., (1997). Frame shift mutation, exon skipping, and a two-codon deletion caused by splice site mutations account for pyruvate kinase deficiency. *Blood.* 89: 4213-8
14. van Wijk, R., van Solinge, W. W., Nerlov, C., Beutler, E., Gelbart, T., Rijksen, G., et al., (2003). Disruption of a novel regulatory element in the erythroid-specific promoter of the human PKLR gene causes severe pyruvate kinase deficiency. *Blood.* 101: 1596-602

15. Diez, A., Gilsanz, F., Martinez, J., Perez-Benavente, S., Meza, N. W. and Bautista, J. M., (2005). Life-threatening nonspherocytic hemolytic anemia in a patient with a null mutation in the PKLR gene and no compensatory PKM gene expression. *Blood*. 106: 1851-1856
16. Beutler, E. and Gelbart, T., (2000). Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gene frequency in the general white population. *Blood*. 95: 3585-8
17. Mohrenweiser, H. W., (1981). Frequency of enzyme deficiency variants in erythrocytes of newborn infants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78: 5046-50
18. Miwa, S. and Fujii, H., (1996). Molecular basis of erythroenzymopathies associated with hereditary hemolytic anemia: tabulation of mutant enzymes. *Am J Hematol*. 51: 122-32
19. Richard, R. E., Weinreich, M., Chang, K. H., Ieremia, J., Stevenson, M. M. and Blau, C. A., (2004). Modulating erythrocyte chimerism in a mouse model of pyruvate kinase deficiency. *Blood*. 103: 4432-9
20. Zaucha, J. A., Yu, C., Lothrop, C. D., Jr., Nash, R. A., Sale, G., Georges, G., et al., (2001). Severe canine hereditary hemolytic anemia treated by nonmyeloablative marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 7: 14-24
21. Cazzola, M., (2005). Pyruvate kinase deficiency. *Haematologica*. 90: 1-2
22. Tanphaichitr, V. S., Suvatte, V., Issaragrisil, S., Mahasandana, C., Veerakul, G., Chongkolwatana, V., et al., (2000). Successful bone marrow transplantation in a child with red blood cell pyruvate kinase deficiency. *Bone Marrow Transplant*. 26: 689-90

23. Suvatte, V., Tanphaichitr, V. S., Visuthisakchai, S., Mahasandana, C., Veerakul, G., Chongkolwatana, V., et al., (1998). Bone marrow, peripheral blood and cord blood stem cell transplantation in children: ten years' experience at Siriraj Hospital. *Int J Hematol.* 68: 411-9
24. Min-Oo, G., Fortin, A., Tam, M. F., Nantel, A., Stevenson, M. M. and Gros, P., (2003). Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nat Genet.* 35: 357-62
25. Morimoto, M., Kanno, H., Asai, H., Tsujimura, T., Fujii, H., Moriyama, Y., et al., (1995). Pyruvate kinase deficiency of mice associated with nonspherocytic hemolytic anemia and cure of the anemia by marrow transplantation without host irradiation. *Blood.* 86: 4323-30
26. Kanno, H., Utsugisawa, T., Aizawa, S., Koizumi, T., Aisaki, K., Hamada, T., et al., (2007). Transgenic rescue of hemolytic anemia due to red blood cell pyruvate kinase deficiency. *Haematologica.* 92: 731-7
27. Tani, K., Yoshikubo, T., Ikebuchi, K., Takahashi, K., Tsuchiya, T., Takahashi, S., et al., (1994). Retrovirus-mediated gene transfer of human pyruvate kinase (PK) cDNA into murine hematopoietic cells: implications for gene therapy of human PK deficiency. *Blood.* 83: 2305-10
28. Li, Z., Modlich, U. and Baum, C., (2004). Safety and efficacy in retrovirally modified haematopoietic cell therapy. *Best Pract Res Clin Haematol.* 17: 493-503
29. Klein, C. and Baum, C., (2004). Gene therapy for inherited disorders of haematopoietic cells. *Hematol J.* 5: 103-11

30. Wang, C., Chiarelli, L. R., Bianchi, P., Abraham, D. J., Galizzi, A., Mattevi, A., et al., (2001). Human erythrocyte pyruvate kinase: characterization of the recombinant enzyme and a mutant form (R510Q) causing nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood*. 98: 3113-20
31. Valentini, G., Chiarelli, L. R., Fortin, R., Dolzan, M., Galizzi, A., Abraham, D. J., et al., (2002). Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. *J Biol Chem*. 277: 23807-14
32. Meza, N. W., Quintana-Bustamante, O., Puyet, A., Rio, P., Navarro, S., Diez, A., et al., (2007). In Vitro and In Vivo Expression of Human Erythrocyte Pyruvate Kinase in Erythroid Cells: A Gene Therapy Approach. *Hum Gene Ther*. 18: 502-14
33. Steiner, L. A. and Gallagher, P. G., (2007). Erythrocyte disorders in the perinatal period. *Semin Perinatol*. 31: 254-61
34. Afriat, R., Lecolier, B., Prehu, M. O., Sauvanet, E., Bercau, G., Audit, I., et al., (1995). [Prenatal diagnosis of homozygous pyruvate kinase deficiency]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 24: 81-4
35. Muench, M. O., (2005). In utero transplantation: baby steps towards an effective therapy. *Bone Marrow Transplant*. 35: 537-47
36. Surbek, D., Schoeberlein, A. and Wagner, A., (2008). Perinatal stem-cell and gene therapy for hemoglobinopathies. *Semin Fetal Neonatal Med*. 13: 282-90

37. Rio, P., Martinez-Palacio, J., Ramirez, A., Bueren, J. A. and Segovia, J. C., (2005). Efficient engraftment of in utero transplanted mice with retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Gene Ther.* 12: 358-63
38. Hildinger, M., Abel, K. L., Ostertag, W. and Baum, C., (1999). Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol.* 73: 4083-9
39. Miwa, S., Fujii, H., Takegawa, S., Nakatsuji, T., Yamato, K., Ishida, Y., et al., (1980). Seven pyruvate kinase variants characterized by the ICSH recommended methods. *Br J Haematol.* 45: 575-83
40. Beauchemin, H., Blouin, M. J. and Trudel, M., (2004). Differential regulatory and compensatory responses in hematopoiesis/erythropoiesis in alpha- and beta- globin hemizygous mice. *J Biol Chem.* 279: 19471-80
41. Chang, K. H., Tam, M. and Stevenson, M. M., (2004). Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. *Blood.* 103: 3727-35
42. Navarro, S., Meza, N. W., Quintana-Bustamante, O., Casado, J. A., Jacome, A., McAllister, K., et al., (2006). Hematopoietic Dysfunction in a Mouse Model for Fanconi Anemia Group D1. *Mol Ther.* 14: 525-535
43. Meza, N. W., Puyet, A., Perez-Benavente, S., Quintana-Bustamante, O., Diez, A., Bueren, J. A., et al., (2006). Functional analysis of gammaretroviral vector transduction by quantitative PCR. *J Gene Med.* 8: 1097-104

44. Villella AD, Y. J., Getty RR, Juliar, BE, Constantin Y, Hartwell JR, Cai S, Sadat MA, Cornetta K, Williams DA and Pollok KE., (2005). Real-Time PCR: An Effective Tool for Measuring Transduction Efficiency in Human Hematopoietic Progenitor Cells. *Mol. Therapy*. 11: 483-491
45. Rovira, A., De Angioletti, M., Camacho-Vanegas, O., Liu, D., Rosti, V., Gallardo, H. F., et al., (2000). Stable in vivo expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and rescue of G6PD deficiency in stem cells by gene transfer. *Blood*. 96: 4111-7
46. Dong, W. J., Li, B., Liu, D. P., Zu, Z. X., Li, J., Hao, D. L., et al., (2003). Evaluation of optimal expression cassette in retrovirus vector for beta-thalassemia gene therapy. *Mol Biotechnol*. 24: 127-40
47. Persons, D. A. and Tisdale, J. F., (2004). Gene therapy for the hemoglobin disorders. *Semin Hematol*. 41: 279-86
48. Gilsanz, F., Vega, M. A., Gomez-Castillo, E., Ruiz-Balda, J. A. and Omenaca, F., (1993). Fetal anaemia due to pyruvate kinase deficiency. *Arch Dis Child*. 69: 523-4
49. Wood, T., (1968). The inhibition of pyruvate kinase by ATP. *Biochem Biophys Res Commun*. 31: 779-85
50. Xu, J., Christian, B. and Jump, D. B., (2006). Regulation of rat hepatic L-pyruvate kinase promoter composition and activity by glucose, n-3 polyunsaturated fatty acids, and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist. *J Biol Chem*. 281: 18351-62

51. Miwa, S., Kanno, H., Hirono, A. and Fujii, H., (1995). Red cell enzymopathies as a model of inborn errors of metabolism. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 26 Suppl 1: 112-9
52. Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L., et al., (2009). Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med*. 360: 447-58
53. Kustikova, O., Fehse, B., Modlich, U., Yang, M., Dullmann, J., Kamino, K., et al., (2005). Clonal Dominance of Hematopoietic Stem Cells Triggered by Retroviral Gene Marking. *Science*. 308: 1171-1174
54. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., et al., (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 302: 415-9
55. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., et al., (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 348: 255-6
56. Laufs, S., Guenechea, G., Gonzalez-Murillo, A., Zsuzsanna Nagy, K., Luz Lozano, M., del Val, C., et al., (2006). Lentiviral vector integration sites in human NOD/SCID repopulating cells. *J Gene Med*. 8: 1197-207
57. Wu, X., Li, Y., Crise, B. and Burgess, S. M., (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*. 300: 1749-51

58. Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. and Bushman, F., (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 110: 521-9
59. Modlich, U., Bohne, J., Schmidt, M., von Kalle, C., Knoss, S., Schambach, A., et al., (2006). Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity
10.1182/blood-2005-08-024976. *Blood*. 108: 2545-2553
60. Moreau-Gaudry, F., Xia, P., Jiang, G., Perelman, N. P., Bauer, G., Ellis, J., et al., (2001). High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors. *Blood*. 98: 2664-72
61. Richard, E., Mendez, M., Mazurier, F., Morel, C., Costet, P., Xia, P., et al., (2001). Gene therapy of a mouse model of protoporphyria with a self-inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection. *Mol Ther*. 4: 331-8
62. Zychlinski, D., Schambach, A., Modlich, U., Maetzig, T., Meyer, J., Grassman, E., et al., (2008). Physiological Promoters Reduce the Genotoxic Risk of Integrating Gene Vectors. 16: 718-725
63. Almarza, E., Rio, P., Meza, N. W., Aldea, M., Agirre, X., Guenechea, G., et al., (2007). Characteristics of Lentiviral Vectors Harboring the Proximal Promoter of the vav Proto-oncogene: A Weak and Efficient Promoter for Gene Therapy. *Mol Ther*. 15: 1487-94

**IMMUNORESPONSES AGAINST EXOGENOUS TRANSGENES LIMIT THE
ENGRAFTMENT OF *IN UTERO* TRANSPLANTED FETAL LIVER STEM
CELLS TRANSDUCED WITH LENTIVIRAL VECTORS**

M.E. Alonso -Ferrero, A. Valeri , R. Yañez , S. Navarro, J.A. Bueren and J.C.
Segovia.

Hematopoietic Gene Therapy Division, CIEMAT -CIBERER Instituto Salud
Carlos III, Madrid, Spain

*Corresponding author: Jose C. Segovia, Hematopoietic Gene Therapy
Program, CIEMAT, Av. Complutense 22, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 346
6268. Fax: 34 91 346 6484. E-mail: jc.segovia@ciemat.es

ABSTRACT

In utero cell and gene therapy are alternatives to the postnatal treatment of diseases that can be diagnosed in early stages of development. We have previously demonstrated that *in utero* transplantation of transduced hematopoietic progenitors from adult syngenic mice efficiently engraft in the long-term. The transplantation of fetal liver transduced cells constitutes a more realistic option because these cells could be obtained from the affected fetus, and then subjected to genetic treatment and re-infusion *in utero*. In the present experiments, hematopoietic lineage negative fetal liver cells from 14.5 days old fetuses were transduced for 6 hours with a lentiviral vector expressing the enhanced green fluorescent protein (EGFP), in presence of different combinations of cytokines. Up to 70% of transduction efficiency in granulomacrophage colony forming cells was obtained when cells were transduced in retronectin-coated dishes and stimulated with mSCF, TPO and Flt3L. Transductions conducted in the presence of IL-11 and mSCF -a cytokine combination very efficient for the transduction of adult HSCs- were less efficient. The analysis of the *in vivo* repopulating ability of transduced syngenic cells after *in utero* transplantation clearly showed that the level of repopulation was inversely related to the transduction efficacy of the samples. Although, the fetal stage has been considered a pre-immune status, allogeneic immunoresponses have been already described. Remarkably, we observed that mice positive for EGFP-expressing cells did not show evidences of an immunoresponse against the transgene. On the contrary, non-engrafted recipients presented antibodies and cellular responses against EGFP, indicating a fetal immunoreaction against

the transduced cells. In conclusion, these results show that fetal liver cells can be transduced very efficiently with short periods of incubation and with low viral dosis and demonstrate for the first time that mice fetuses can develop both humoral and cellular immunoresponses against exogenous transgenes, an observation that should be considered for future strategies of *in utero* gene therapy.

INTRODUCTION

Bone marrow transplantation in adult recipients is a successful therapy for the treatment of a wide range of hematopoietic disorders [1]. This kind of transplant requires a compatible donor and a myeloablation treatment to facilitate the engraftment of the exogenous healthy cells. Major complications of this therapy are graft versus host disease (GVHD) and graft rejection that compromise the success of the treatment and the survival of the patient [2]. Moreover, in some inherited diseases in which bone marrow transplantation is required, its application after birth or in the adulthood is not so effective because the pathological changes have already occurred during the fetal development [3] [4]. The last molecular biology advances and the possibility of chorionic villus sampling in the first trimester of gestation have facilitated an early prenatal diagnosis [5]. These technical improvements permit to treat the fetuses during the theoretical window of opportunity (between the last weeks of the first trimester and the second trimester in humans) which confer advantage in the receptivity of graft and specific tolerance induction to exogenous cells [6]. Therefore, *in utero* hematopoietic cell transplantation (IUHCT) might avoid many of the problems due to postnatal therapy because the early gestational immune system undergoes a process of self-education that could facilitate the engraftment of healthy or genetically corrected cells [1] [7].

The principal source of hematopoietic cells for transplantation in humans and in animal models is adult bone marrow and, with less frequency, umbilical cord blood. However, for IUHCT fetal liver hematopoietic progenitors, should be a

very good choice because recipient and graft have the same developmental age [7]. In addition, differences in surface markers expression [8] could confer fetal liver HSCs engraftment and homing advantages after IUHCT. Recent studies show that fetal liver hematopoietic stem cells (HSCs) are in a more proliferative stage than adult bone marrow HSCs [9] [10] and have a different regulation by transcriptional factors expression [11]. These findings could confer different conditions for in vitro lentiviral transduction. Some successful trials transplanting corrected fetal liver hematopoietic cells in adult mice have been addressed [12].

Previous data obtained in our laboratory showed a long-term and multilineage engraftment of adult bone marrow syngeneic HSC retrovirally transduced *ex-vivo* and transplanted *in utero* in 14.5 mouse fetuses [13]. Evidences of *in utero* engraftment of allogeneic cells have been reported in different animal models and in humans [1] [14]. However, it is not well known how the developing immune system is working in fetuses. Recently, evidences of long-term chimerism fail after IUHCT of allogeneic grafts in mouse models have been reported [15] suggesting an immunocompetent status of the fetuses. The use of autologous corrected donor cells for transplant could avoid the possible problems associated to the rejection of allogeneic cells by the receptor. Moreover, animal models of ex-vivo gene therapy prevent the direct exposure to the transfer vector avoiding the gene transfer to non-target cells (i.e. germ-line) and could reduce the risk of immunoreaction to the transgene [16] [3].

In this study we have optimized the conditions for *in vitro* transfer of fetal liver hematopoietic progenitors and we have used a syngeneic mouse model to test the ability of engraftment of lentivirally transduced fetal liver HSC after IUHCT in the short and in the long term. In addition, we have tested humoral and cellular immunoresponses against EGFP, showing for the first time the existence of immunoresponse on transplanted mice against the transgenic protein.

MATERIAL AND METHODS

Mice

For adult or *in utero* hematopoietic transplants, F1 hybrids of the B6.SJL - PtprcaPep3b/BoyJ and the DBA/2J strains (Ly5.1/Ly5.2 phenotype) were used as donors, and F1 hybrids of the C57BL/6J and the DBA/2J strains (Ly5.2/Ly5.2 phenotype) were used as recipients. Mice were maintained under high standard conditions (HEPA filtered air, regulated temperature of 22°C, light/dark cycle of 12 hours, and allowed food and UV irradiated water *ad libitum*) and routinely screened for pathogens. All experimental procedures were carried according to Spanish and European regulations (Spanish R.D 223/88 and O.M. 13-10-89 of the Ministry of Agricultural, Food and Fisheries about the protection and use of animals in scientific research; European convention ETS -123, about the use and protection of vertebrate mammals used in experimentation and other scientific purposes).

Lentiviral supernatants

293T cells were transiently transfected with three plasmids codifying the envelope and packaging viral sequences, pMD2.VSV.G, pMDLg-pRRE and pRSV-REV, and a transfer plasmid codifying the eGFP reporter gene, pRRLsin18.PPT.CMV.eGFP.Wpre (kindly granted by Dr. Naldini). 293T cells were plated on 150cm of diameter plates; the transfection was done when the confluence was about 80% as previously described [17] [18]. The supernatant was collected 30 hours after transfection and centrifuged for concentration. Viral pellets were resuspended in PBS and frozen at -80°C until use.

Donor fetal liver progenitors

Fetal liver cells were obtained from 14.5 days old fetuses. Fetal livers were disaggregated and filtered to eliminate cellular fragments and clusters. Then, the cells were resuspended in PBE (PBS 1x + 0.5 % BSA + 2mM EDTA) and subjected to hematopoietic stem cell (HSC) enrichment by lineage depletion. Lin⁻ cells were sorted out using the Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotech, Germany) following manufacturer's recommendations. Briefly, cells were stained with biotinylated lineage antibody cocktail for 10 min at 4 °C. After that, cells were stained again with anti-biotin MicroBeads for 15 minutes at 4 °C. Then, cells were washed with PBE and subjected to a negative immunomagnetic selection using a MS type column (Miltenyi Biotec). Lin⁻ cells were washed with PBE and resuspended in PBS. On average a 90% pure population of Lin⁻ was obtained, being the recovery 30% -60% of the input number of Lin⁻ cells.

Transduction of Lin⁻ cells with lentiviral vectors

Lin⁻ cells were resuspended in IMDM supplemented with 20% FBS, 1% glutamine and 0,5% penicillin-streptomycin at a density of 5×10^5 cells/ml.

Viruses were added at a MOI of 10 and the time of infection was 6 hours.

During the transduction the medium was supplemented with two different combinations of cytokines: hIL11 and mSCF (100 ng/ml each, provided by R&D Systems), or mSCF (100 ng/ml; R&D Systems), Flt3 (100 ng/ml; Miltenyi Biotech) and TPO (300 ng/ml each; R&D Systems), in absence or presence of retronectin (Takara Shuzo, Otsu, Japan). After this period of time, cells were washed to take the viruses off and resuspended in PBS.

In vitro colony forming assays

To determine the number of myeloid colony forming units (CFU-C), fetal liver cells were seeded in MethoCult GF M3534 culture medium (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and plated in triplicate on 35-mm plastic tissue culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) and cultured at 37 °C in 5% CO₂ and fully humidified air. Seven days after plating, overall colony numbers and EGFP⁺ colonies were scored.

Hematopoietic transplant in adult recipients

8 to 12 weeks old recipients were irradiated using a myeloablative regimen (11 Gy fractionated in two doses, 24 hours apart) with a Philips MG324 X-ray equipment (Philips, Hamburg, Germany) set at 300 kV, 10 mA, delivering a dose rate of 1.03 Gy/min. $2-3 \times 10^5$ Lin⁻ transduced cells from syngeneic 14.5 dpc fetal livers were transplanted into five adult recipients per group. At 30, 60 and

90 days post -transplantation, blood from these animals was obtained and analysed for chimerism by flow cytometry.

In utero transplantation

On day 14.5 after mating, pregnant females were anesthetized by inhalatory anesthesia (isoflurane). The abdomen was opened by midline laparotomy and the uterine horns were exposed. Each fetus was injected intraperitoneally with $2-3 \times 10^5$ Lin⁻ cells in 5 μ l of PBS using a 100 μ m beveled glass micropipette. Fetuses were rehydrated with PBS and reintroduced into the peritoneal cavity, which was closed in two layers using reabsorbable suture (Ethicon PDS II 5/0; Johnson & Johnson, Brussels, Belgium). After that each mother was injected subcutaneously with 0.15 mg/weight mg of Buprenorphine (Buprex, Reckitt Benckiser Healthcare Ltd.) as analgesic. After birth, the survival offspring (more than 60%) was analyzed to evaluate the chimerism and transduction efficiency by EGFP expression.

Analysis of chimerism

Chimerism was evaluated in the peripheral blood from adult and from *in utero* transplanted mice (primary recipients), and from secondary recipients. Blood was taken after a small tail vein incision, and chimerism was assessed by flow cytometry, using anti-Ly5.1-PE (BD Pharmingen). A minimum number of 10^4 - 10^5 viable cells were acquired. Off-line analysis was done with CXP Software (Beckman Coulter). The presence of transgene expressing cells was determined by EGFP expression.

ELISA for measuring anti-EGFP antibodies.

Mouse sera were collected and stored at -20°C until the experiment ended. EGFP protein was diluted to $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ in carbonate -bicarbonate buffer (Sigma -Aldrich, St. Louis, MO) and absorbed to ELISA plates overnight. The plates were blocked with 5% BSA in PBS for 1h at 4°C . Mouse sera were diluted in PBS with 5% BSA. The plates were washed with 0,05% Tween in PBS. Bound antibodies were detected with goat anti -mouse IgM or IgG horseradish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Antibodies:antigens complex were developed using 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine substrate (TMB, Pierce). The reaction was stopped using 0,18M H_2SO_4 . The absorbance was read at 450nm. The positive signal was at least twice the background absorbance. As negative control was used a pool of sera of wildtype mice.

EGFP-specific proliferation

Splenocytes were isolated from mouse spleen and dispersed in 10ml of DMEM. Erythrocytes were lysed with NH_4Cl 0,84% and washed three times with DMEM. Cell count and viability were assed by trypan blue dye. 2×10^5 splenocytes were incubated with $10\mu\text{g/ml}$ rEGFP at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. At day 3, 10U recombinant interleukin -2 (rIL2) was added. After 7 days of incubation, the cells were pulsed during the last 18 hours with $[\text{}^3\text{H}]^1$ thymidine ($1\mu\text{Ci}$ per well). $[\text{}^3\text{H}]^1$ thymidine incorporation was measured as described above. As proliferation control, 2×10^5 splenocytes in $200\mu\text{l}$ of complete medium were incubated during 3 days with phytohemagglutinin (PHA) at a final concentration $10\mu\text{g/ml}$.

ELISA for measuring mouse IFN γ

IFN γ released by activated cells was measured in supernatants collected after day 5 by a cytokine ELISA (Mouse IFN γ , Bender MedSystem). Briefly, an anti-mouse IFN γ coating antibody is absorbed onto microwells. Mouse IFN γ present in the sample binds to antibodies adsorbed to the microwells. A biotin-conjugated anti-mouse IFN γ antibody is added and binds to mouse IFN γ captured by the first antibody. The plate is washed with 1% Tween20 in PBS. Streptavidin-HRP is added and the plate is incubated at room temperature for 1 hour. The plate is washed three times with 1% Tween20 in PBS. TMB Substrate solution was added to all wells. After 10 minutes, the reaction is stopped with 1M phosphoric acid. The absorbance is measured at 450nm (Genios Tecan).

Proviral DNA analysis

To assess the viral copy number in each animal, the EGFP sequence from the lentiviral vector was assayed in transduced cells by real-time PCR. Primers and TaqMan MGB probe were designed with the aid of the Primers Express software program (Applied Biosystems). The specific EGFP detector was composed of the forward primer: F1EGFP 5' GTAAACGGCCACAAGTTCA GC; reverse primer R1EGFP 5' TGGTGCAGATGAACTTCAGGG and the TaqMan MGB probe PEGFP 5' 6-FAM-CTTGCCGTAGGTGGC-MGB. DNA was isolated from 5×10^5 bone marrow cells using the Puregene kit (Promega, Madison, WI, USA). Genomic DNA was resuspended in 200 μ L of TE Buffer (10 mM Tris with 0.1 mM EDTA), incubated at 65°C for 30 min, vortexed, and stored at 4°C. For real-time PCR analysis, 5 μ L of genomic DNA (to 5 ng/ μ L) were mixed with 20 μ L of a PCR master mix consisting of 1X TaqMan universal master mix, 200 nM

of each primer (F1EGFP/R1EGFP) and 200 nM of the MGB probe (PEGFP). For negative controls, we used 5 μ L of H₂O and 5 μ L of genomic DNA from untransduced cells. All reactions were conducted in triplicate and amplifications were performed as one cycle of 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 30s and 58°C for 30s. The average number of provirus copies per cell was quantified using a standard curve for the retroviral plasmid as described previously ().

Statistical analysis

The significance of differences between groups was determined by using the Wilcoxon Mann-Whitney W test. The processing and statistical analysis of the data was performed by using the Statgraphics Plus 5.0 software package (Manugistics, Inc. Rockville, MD).

RESULTS

In vitro lentiviral transduction of fetal liver progenitors in presence of mSCF, Flt3, hTPO and retronectin considerably improves the percentage of transduction preserving progenitor potentiality

To assess the best conditions for transduction, 14,5-days old lineage negative fetal liver cells were infected using different periods of infection, different multiplicities of infection (MOI), different combinations of growth factors and in the presence or absence of retronectin. After the infection, cells were washed and cultured in semisolid media for the evaluation of committed progenitors

content. The number of myeloid colony forming units (CFU-C) was used to test the progenitor's potentiality of transduced fetal liver cells. We would like to minimize the manipulation of the cells. Taking into account that fetal liver cells were supposed to be in a more proliferative active stage, we proposed to transduce fetal liver cells using very short time periods and low MOI. As it is shown in figure 1, very good transduction efficiencies were obtained with 3 hours of infection. Best results were obtained at MOI 10 for 6 hours, up to 63% of transduction efficiency in CFU-GM progenitors. Two different combinations of growth factors were compared, IL-11 + mSCF and mSCF + hTPO + Flt3. The combination of growth factors mSCF, hTPO and Flt3 improved the number of progenitors with ability to form CFU-C without significative improvement in transduction efficiency. Infections done in plates pre-treated with retronectin resulted in higher numbers of CFU-C (Figure 1A) and in better percentages of transduction. There were no significative differences in the percentages of transduction between MOI 5 and MOI 10. Overall, the presence of mSCF, Flt3 and hTPO in the media during the infection period in plates pre-treated with retronectin for 6 hours, improved considerably the percentage of cells expressing EGFP, reaching the 63% (figure 1B) of transduction in semisolid culture and exceeding the 75% of transduction in liquid culture after 7 days of infection (data not shown). Periods of infection higher than 6 hours affect the viability fetal liver progenitors (data not shown) and were not considered.

Long-term engraftment of lentivirally transduced fetal liver progenitors and EGFP stable expression in adult recipients

Aiming to evaluate the ability of engraftment of transduced fetal liver progenitors after the short infection protocol, we transplanted irradiated adult recipients with cells transduced in presence of two different combinations of growth factors, mSCF + IL -11 and mSCF + Flt3 + hTPO , in the presence or absence of retronectin. In all experiments, 6 hours of infection and a MOI of 10 were used . To identify the origin of the cells CD45.1 animals were used as donors and CD45.2 as recipients. At 30 days post-transplantation, a good reconstitution of hematopoiesis of the recipients from fetal liver transduced cells was obtained, reflected in the percentages of EGFP expressing blood cells (Figure 2A).

Figure 2B shows that transduced fetal liver progenitors were able to repopulate the hematopoiesis of lethally irradiated mice in the short and in the long term. The combination of growth factors and the presence of retronectin were not relevant parameters affecting the engraftment. In all the experimental groups we could detect EGFP expression held in the long term (figure 2B). Similar to the results obtained with CFU -Cs, the group grafted with cells transduced in presence of mSCF, Flt3, hTPO and retronectin showed the highest level of EGFP positive cells (figures 2 C). An average of 30% EGFP expressing cells was maintained until 90 days post-transplant in this experimental group, while animals transplanted with the other conditions did not show more than 2-1% of transduced cells in peripheral blood.

Additionally we transplanted irradiated secondary recipients with bone marrow cells from animals previously grafted with transduced fetal liver progenitors (figure 3). Two animals per group, one with high and the other one with low percentage of EGFP expressing cells in the blood were selected in each group as donors for the secondary transplant. In all the experimental groups the secondary recipients were grafted completely with bone marrow cells from the donors and the percentage of engraftment was maintained as far as 60 days after transplantation. Moreover, these mice showed similar or even higher percentages of EGFP expressing cells in blood than donors BM, indicating that efficiently transduced long term hematopoietic stem cells could become quiescent in the primary recipients and got activated in the secondary transplant (figure 3).

Lentivirally transduced Lin⁻ fetal liver cells efficiently engraft in fetal mice with a low percentage of EGFP expressing cells

In utero transplantation experiments were performed with two different experimental groups. The first group of fetuses was transplanted with fetal liver progenitors transduced in presence of mSCF and hIL11, as a combination of good long term repopulating ability maintenance (LTRA) and low transduction efficiency, and the second one was transplanted with fetal liver progenitors transduced in presence of mSCF, Flt3, hTPO in retronectin pre-treated plates, as the best combination for LTRA maintenance and transduction efficiency. In both groups the cells were infected during 6 hours at a MOI of 10.

To assess for the presence of donor cells in the recipients transplanted before birth and the stability of engraftment, the percentage of CD45.1 positive cells in peripheral blood was determined by flow cytometry at different times post-birth (figure 4A). When the first combination was used for transduction, 68% of the transplanted animals showed stable engraftment, with a range between 0,2 to 6 % and a median value of 1,3 % (see table 1 and Figure 4 B). The percentage of stable grafted mice was reduced to 35% when the second combination was used.

When the transgene expression was tested, the percentage of donor grafted cells expressing EGFP was much higher when the second combination of cytokines was used, with transduction efficiencies up to 60% of EGFP⁺ of the exogenous grafted hematopoietic cells. These data correlate with the data obtained *in vitro*, in which percentage of transduction using the same infection conditions was, in average, 64%. Very low transduction efficiencies were observed in the animals transplanted with the cells transduced with IL-11 + mSCF, even though the percentages of engraftment were higher. Thereby, fetal liver hematopoietic primitive cells (Lin⁻) transduced with lentiviral vectors in presence of mSCF and hIL11 had a better ability of engraftment *in utero*, in the short as well as in the long term, although a very low efficiency of transduction was observed. On the contrary, the infection of fetal liver progenitor cells in presence of mSCF, Flt3 and TPO in plates pretreated with retronectin allowed higher transduction efficiencies when analyzed *in vivo* but impair engraftment ability.

Mice fetuses in utero transplanted with transduced cells develop an immunoresponse to the exogenous transgen avoiding the engraftment

To determine whether mice transplanted *in utero* with highly transduced hematopoietic progenitors have developed immunoresponse to EGFP we first determined the presence of antibodies antiEGFP in serum. Sixty one percent of animals analyzed showed antibodies against the exogenous protein, but none of them presented EGFP⁺ cells despite a 26% of these animals were long-term engrafted. We could establish 4 groups: G1 corresponds to mice engrafted with no EGFP⁺ cells showing antibodies antiEGFP, G2 corresponds to non-engrafted mice showing antibodies antiEGFP, G3 include s non-engrafted animals without antibodies antiEGFP and G4 includes engrafted animals without antibodies antiEGFP. Eight percent of animals analyzed did not show antibodies against the transgeneic protein but present between 6 and 60% of EGFP⁺ long-term engrafted cells (figure 5).

With the aim of evaluate the type of specific humoral immunoresponse, nine mice were injected with 2 µg of rEGFP five months post-birth. Serum was collected every two days after injection and IgGs and IgMs against EGFP were tested by ELISA (figure 6). A 22.2% of mice analyzed showed secondary response to EGFP. None of them present EGFP⁺ cells.

Cellular immunoresponse to EGFP was evaluated in 12 *in utero* transplanted mice by means of induction of T cell proliferation and INF γ production after EGFP exposure. A 33.3% of mice analyzed showed cellular response as well as humoral response, two of them (#17 and #23) showed long-term engraftment

but not EGFP⁺ cells. Additionally, splenocytes from mice #17 and #6 also secreted INF γ in presence of rEGFP after 5 days in culture.

Altogether, the data obtained demonstrates the establishment of a complete immunoresponse against the transgeneic protein that resulted in impaired engraftment and elimination of EGFP expressing cells.

DISCUSSION

In utero transplantation of HSCs has been developed in the last 3 decades as an alternative to postnatal therapy for the treatment of a wide range of inherited diseases. First attempts were performed in mice and sheep and showed significative levels of quimerism without myeloablative treatment. *In utero* transplantation in human fetuses has been successful only in immunodeficient patients [7]. Recently, Peranteau et al (2007) reported fail of engraftment in mouse fetuses transplanted *in utero* with allogeneic cells, suggesting that fetuses could develop an immunoresponse. This observation makes more interesting to explore the possibility of an autologous transplant with genetically corrected hematopoietic progenitors for the treatment of diseases that could be diagnosed during fetal life.

In this scenario, the source of autologous hematopoietic progenitors could be the like fetal liver. It has been described that fetal liver exhibit higher repopulation ability than bone marrow [19] [20] [21], mainly in prenatal transplants [22] [23] [21] [24], but other authors could not observe good percentages of quimerism after *in utero* transplantation of transduced fetal liver cells [25].

In this work, we have tested the transplant of genetically marked syngeneic fetal liver hematopoietic progenitors into wild-type 14.5 days old fetuses. Because of fetal liver cells show different characteristics in terms of viral transduction and hematopoietic repopulation, we have studied specific *ex vivo* manipulation conditions. We assay different combinations of transduction conditions with the aim of obtaining high percentages of transduction with low MOI (5 and 10) and preserving the ability of engraftment of genetically corrected cells. The highly proliferative stage of fetal liver hematopoietic stem cells [9] and the use of lentiviral vectors, that can transduce non-dividing cells [26] [27], permit to shorten the protocol avoiding the pre-stimulation period. The percentage of EGFP⁺ progenitors obtained after protocols of 3 hours of infection did not seem dependent on transduction conditions. Moreover, transductions of 6 hours showed the relevance of using retronectin pre-treated plates. In our experiments we use VSV-G pseudotyped lentiviral vectors which could not join to CH-296 fragment of fibronectin (retronectin) [28], however, it has been described that retronectin is involved in increasing of survival and gene transfer independently of viral tropism [29], and our results suggested the same observation.

It has been described that IL11 and mSCF in combination maintain and expand bone marrow HSC compartment in culture [30] [31]. We could not see the same effect with fetal liver cells, reaching lower percentages of transduction when this combination was added. These data are coincident with the observation of Bowie et al that reported an inhibitory effect in HSC autorrenovation ability [32]. On the contrary, we reached percentages of EGFP⁺ progenitors over 59%.

preserving the total number of CFU-GMs when we added mSCF, Flt3 and TPO in the culture medium during the transduction. It has been reported that SCF and TPO promotes survival and expansion of Lin⁻ fetal liver hematopoietic cells [33] [34] [35]. On the other hand, it has been also described that Flt3 receptor, with an important implication in hematopoiesis maintenance [36], is expressed in fetal liver LT-HSC but not in adult bone marrow LT-HSC [37] [38] [39]. The combination of these 3 factors has been widely used for culture maintenance and transduction of umbilical cord blood hematopoietic progenitors [40] [41]. This is the first report using these cytokines with fetal liver progenitors.

In vivo assays corroborated that the ability of multilineage and multiorgan engraftment was preserved in transduced fetal liver progenitors injected in irradiated adult mice, independently of the combination of cytokines used during the transduction procedure. Moreover, the percentage of transduction was always higher when mSCF, Flt3 and TPO were used. Additionally, the percentage of EGFP⁺ cells was maintained stable until 90 days post-transplant and until 60 days post-transplant in secondary recipients.

Altogether, our data show, for the first time, that fetal liver hematopoietic progenitors can be transduced with lentiviral vectors using low multiplicities of infection and short periods of exposition to the vector in an optimal combination of cytokines (mSCF, FLT3 and TPO) and in presence of retronectin, preserving the ability of engraftment in adult recipients.

Animals transplanted *in utero* were long-term engrafted (until 150 days post-birth) with transduced fetal liver progenitors. When mSCF and IL11 were used during the transduction, the percentage of quimerism was higher (1.3%), but we could not observe elevated percentages of EGFP⁺ cells by flow cytometry. On the other hand, the percentage of grafted donor cells was reduced when we transplanted cells transduced in presence of mSCF, Flt3 and TPO. However, using these conditions we could detect higher proportions of EGFP⁺ cells in the grafts. Additionally, a decreased percentage of engrafted animals was detected in the second experimental group (34%) comparing with the first one (68%), and with that observed in animals transplanted with non-manipulated fetal liver progenitors (86%). Interestingly, 34% of engrafted animals is coincident with percentages previously reported after *in utero* transplantation of allogeneic bone marrow cells [42] and transduced syngeneic bone marrow progenitors [13]. These lower percentages of engrafted mice were observed when high transductions efficiencies were obtained in the grafts before transplantation. The detection of antibodies against EGFP and the EGFP-specific proliferation assays clearly demonstrated that these fail of engraftment was due to an immunoresponse of the recipient fetuses to the exogenous transgeneic protein introduced by gene transfer.

One of the theoretical advantages of *in utero* cellular and gene therapy was the preimmune status of the fetus, but there are a number of indirect arguments supporting an immunologic barrier to engraftment. The fact that only immunodeficient human fetuses have obtained clear clinical profit after IUHCT is suggestive. Moreover, the existence of T cells with TCR rearrangement in

human fetal liver in the 13th week of gestation has been reported [43] and fetal liver NK cells and T cells are alloreactive against MHC *in vitro* [44] [45] [46]. This could justify a fail of engraftment of fetal liver hematopoietic cells transplanted *in utero* in allogeneic recipients [47] [48]. In fact, recent studies suggested the existence of immunoreaction when the fetus was exposed to allogeneic cells [15].

Direct administration of viral vectors in fetuses has been used to induce tolerization [3], but it has been reported immune response to lacZ in B6/129F1 mice after prenatal injection of adenovirus or AAV carrying this transgene [49].

It has been described immunoresponse against transgenes expressed by transplanted cells in partially or totally myeloablated adult animals [50] [51]. EGFP is the most studied immunogenic molecule, but the ability of other xenogeneic proteins as enhanced yellow fluorescence protein (EYFP) [50], β -galactosidase [52] and neomycin phosphotransferase (neo) [53], to generate immunoresponse has been reported. Some non-xenogeneic proteins, as α -L-iduronidase, expressed in deficient animals can generate immunoresponse [54]. But it has never been reported until now immunogenicity of xenogeneic proteins expressed for donor cells injected in fetal stage. The decrease of mice with exogenous engraftment after *in utero* transplantation with fetal liver progenitors transduced in presence of mSCF, Flt3, TPO and retronectin (6 hours, MOI 10), without a reduction in the survival rate, strongly indicate the existence of a mechanism of transplanted cell rejection in these animals.

Humoral response assays showed that a 61% of transplanted mice exhibit antibodies against EGFP in serum. These mice did not show EGFP⁺ cells in

peripheral blood, but some of them (26%) were long - term engrafted with non transduced cells. Moreover, 33,3% of analyzed mice showed cellular immunoresponse to EGFP and 22,2% of mice injected with rEGFP showed clear secondary immunoresponse. Interestingly, mice engrafted with transduced cells (8%) did not show any immunoresponse to EGFP 5 months before birth. All these results indicate that mice transplanted *in utero* with lentivirally transduced cells can develop complete and specific immunoresponse against EGFP. This immunoreaction caused rejection of EGFP⁺ cells and fail of engraftment.

Tolerance to EGFP and other exogenous proteins has been widely described in irradiated adult mice [55] [56] [57] [53] [58] and different animal models have been *in utero* long-term engrafted with transduced cells expressing transgenes [59] [54] [13] [16] [60] [61]. Tolerance to allogeneic cells has been also described in prenatal transplants and it has been used to enhance complete chimerism after a postnatal boost [62] [63] [64]. In our experiments, some *in utero* transplanted mice developed tolerance to EGFP after transplantation and maintained long-term engraftment of EGFP⁺ cells indicating that tolerance can take place in some animals. However, the tolerance rate we have got here is much lower than those obtained by others and by ourselves using syngeneic adult progenitor cells. Intrinsic differences between fetal liver and adult hematopoietic progenitors could account for these discrepancies. Most probably, the transplantation of limited numbers of transduced cells and the use of weak promoters could overcome this problem.

In summary, fetal hematopoietic progenitors could be a potential source of cells for gene correction and subsequent *in utero* transplantation for the treatment of inherited diseases. However, special attention should be taken in order to avoid or control the potential immunoresponses of the recipient fetus.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. *In vitro* studies of lentiviral transduction efficiency using different cocktails of cytokines. Lineage negative fetal liver hematopoietic cells from 14.5 days old fetuses were infected with different multiplicities of infection (MOI) and for different times with a VSV -G enveloped lentiviral vector encoding for the enhanced green fluorescent protein (EGFP), in the presence or absence of retronectin and with different growth factors combinations. After the infection, the cells were washed and cultured in semisolid media enriched for the growth of granulomacrophage hemato poietic progenitors (CFU-GM) for the evaluation of committed progenitors content. **A**, total number of colonies scored (solid bars) and number of EGFP⁺ colonies (hatched bars) per 10⁵ seeded cells; **B**, Percentage of EGFP⁺ colonies in each infection condition; (□) hIL11 plus mSCF, (▤) hIL11 plus mSCF in presence of retronectin, (▥) mSCF plus hTPO plus FLT3 -L, (■) mSCF plus hTPO plus FLT3 -L en presence of retronectin.

Figure 2. Long term engraftment of fetal liver cells transduced with lentiviral vectors in adult recipients. Fetal liver hematopoietic progenitors were infected in vitro with lentiviral supernatants during 6 hours at a MOI of 10 in presence of IL11 and SCF (△) or SCF, TPO and FLT3-L with (○) or without (●) retronectin. Transduced cells were then transplanted into adult lethally irradiated recipients and the engraftment was followed over time. **A**, representative flow cytometry analysis of the engraftment of transduced (EGFP⁺) and non -transduced (EGFP⁻) exogenous (Ly5.1⁺) cells (data were

obtained 30 days after transplantation); **B**, percentage of engraftment in recipient mice; **C**, percentage of hematopoietic engrafted cells expressing EGFP. Each symbol represents one single mouse.

Figure 3. Long term engraftment in secondary recipients. Bone marrow cells from adult animals grafted with transduced fetal liver progenitors were transplanted in secondary recipients lethally irradiated. The engrafted cells were followed until 60 days by flow cytometry. The percentage of grafted cells and the percentage of grafted cells expressing EGFP in donor's bone marrow were determined by flow cytometry (left side) before transplant in secondary recipients. The engraftment of transduced (EGFP⁺) and non-transduced (EGFP⁻) exogenous (Ly5.1⁺) cells in secondary recipients was followed until 60 days by flow cytometry analysis. **A**, percentage of engraftment in recipient mice; **B**, percentage of hematopoietic engrafted cells expressing EGFP. Symbols are like in figure 2. Each symbol represents one single mouse.

Figure 4. Kinetics of engraftment and EGFP expression of individual mice after IUT of transduced Lin⁻ cells at different times post-birth. Lin⁻ fetal liver cells from animals expressing Ly -5.1 were transduced for 6 hours at MOI 10 and then transplanted *in utero* into 14.5 days old fetuses expressing the Ly -5.2 hematopoietic antigen. The engraftment was followed until 90 day after birth. **A**, representative flow cytometry analysis of the peripheral blood of two different mice transplanted *in utero* with transduced Lin⁻ cells in presence of mSCF and hIL11 (left panel), or in presence of mSCF, Flt3, TPO and retronectin (right panel)(data were obtained 30 days after transplantation); **B and C. A**,

percentage of engraftment in recipient mice ; **B**, percentage of hematopoietic engrafted cells expressing EGFP.

(Δ) mice engrafted with cells transduced with hIL11 and mSCF in presence of retronectin (\bullet) mice engrafted with cells transduced with mSCF, hTPO and Flt3 in presence of retronectin.


Figure 5. Determination of antibodies anti-EGFP in mice transplanted *in utero*. 150 days post-birth the serum from mice transplanted with progenitors transduced for 6 hours at a MOI of 10, in presence of mSCF, Flt3, hTPO and retronectin was collected and assayed for humoral immune response against EGFP by means of ELISA.

Each point represents one mouse. Green numbers represent mice that showed EGFP⁺ cells. The four groups established are represented in red letters.

Figure 6. Humoral and cellular immunoresponse assays in mice transplanted *in utero*. Humoral immunoresponse was evaluated in mice re-immunized with rEGFP 150 days post birth. **A)** IgM evaluation by means of ELISA; **B)** IgG evaluation by means of ELISA. Each bar represents one mice.

(\square) mouse non engrafted showing secondary response to EGFP ; (\square) mouse non engrafted showing secondary response to EGFP; (\blacksquare) mouse engrafted with EGFP⁺ cells that did not show secondary response to EGFP.

Cellular immunoresponse was evaluated 6 months before birth. **C)** Cellular proliferation in response to EGFP determine by H³-thymidine incorporation. (\square) Splenocytes cultured alone; (\blacksquare) Splenocytes cultured in presence of PHA; (\blacksquare) Splenocytes cultured in presence of EGFP. **D)** INF γ releasing . (\blacksquare) Supernatants

from splenocytes cultured in presence of PHA; ( Supernatants from
splenocytes cultured in presence of EGFP.

References

1. Flake, A. W., (2004). In utero stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 18: 941-58
2. Surbek, D., Schoeberlein, A. and Wagner, A., (2008). Perinatal stemcell and gene therapy for hemoglobinopathies. *Semin Fetal Neonatal Med.* 13: 282-90
3. Waddington, S. N., Kramer, M. G., Hernandez -Alcoceba, R., Buckley, S. M., Themis, M., Coutelle, C., et al., (2005). In utero gene therapy: current challenges and perspectives. *Mol Ther.* 11: 661-76
4. Coutelle, C., Douar, A. M., Colledge, W. H. and Froster, U., (1995). The challenge of fetal gene therapy. *Nat Med.* 1: 864-6
5. Alfirevic, Z. and von Dadelszen, P., (2003). Instruments for chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev.* CD000114
6. Hayashi, S. and Flake, A. W., (2001). In utero hematopoietic stem cell therapy. *Yonsei Med J.* 42: 615-29
7. Muench, M. O., (2005). In utero transplantation: baby steps towards an effective therapy. *Bone Marrow Transplant.* 35: 537-47
8. Kim, I., Yilmaz, O. H. and Morrison, S. J., (2005). CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood.* 106: 903-5
9. Bowie, M. B., McKnight, K. D., Kent, D. G., McCaffrey, L., Hoodless, P. A. and Eaves, C. J., (2006). Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J Clin Invest.* 116: 2808-16

10. Nygren, J. M., Bryder, D. and Jacobsen, S. E., (2006). Prolonged cell cycle transit is a defining and developmentally conserved hemopoietic stem cell property. *J Immunol.* 177: 201-8
11. Kim, I., Saunders, T. L. and Morrison, S. J., (2007). Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell.* 130: 470-83
12. Johansson, M. K., de Vries, T. J., Schoenmaker, T., Ehinger, M., Brun, A. C., Fasth, A., et al., (2007). Hematopoietic stem cell -targeted neonatal gene therapy reverses lethally progressive osteopetrosis in oc/oc mice. *Blood.* 109: 5178-85
13. Rio, P., Martinez-Palacio, J., Ramirez, A., Bueren, J. A. and Segovia, J. C., (2005). Efficient engraftment of in utero transplanted mice with retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Gene Ther.* 12: 358-63
14. Merianos, D., Heaton, T. and Flake, A. W., (2008). In utero hematopoietic stem cell transplantation: progress toward clinical application. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14: 729-40
15. Peranteau, W. H., Endo, M., Adibe, O. O. and Flake, A. W., (2007). Evidence for an immune barrier after in utero hematopoietic-cell transplantation. *Blood.* 109: 1331-3
16. Bigger, B. W., Siapati, E. K., Mistry, A., Waddington, S. N., Nivsarkar, M. S., Jacobs, L., et al, (2006). Permanent partial phenotypic correction and tolerance in a mouse model of hemophilia B by stem cell gene delivery of human factor IX. *Gene Ther.* 13: 117-26
17. Graham, F. L. and van der Eb, A. J., (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology.* 54: 536-9

18. Bacchetti, S. and Graham, F. L., (1977). Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 1590-4
19. Rebel, V. I., Miller, C. L., Eaves, C. J. and Lansdorp, P. M., (1996). The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. *Blood.* 87: 3500-7
20. Pawliuk, R., Eaves, C. and Humphries, R. K., (1996). Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood.* 88: 2852-8
21. Taylor, P. A., McElmurry, R. T., Lees, C. J., Harrison, D. E. and Blazar, B. R., (2002). Allogenic fetal liver cells have a distinct competitive engraftment advantage over adult bone marrow cells when infused into fetal as compared with adult severe combined immunodeficient recipients. *Blood.* 99: 1870-2
22. Hayashi, S., Abdulmalik, O., Peranteau, W. H., Ashizuka, S., Campanoli, C., Chen, Q., et al., (2003). Mixed chimerism following in utero hematopoietic stem cell transplantation in murine models of hemoglobinopathy. *Exp Hematol.* 31: 176-84
23. Oppenheim, S. M., Muench, M. O., Gutierrez-Adan, A., Moyer, A. L., BonDurant, R. H., Rowe, J. D., et al., (2001). Hematopoietic stem cell transplantation in utero produces sheep-goat chimeras. *Blood Cells Mol Dis.* 27: 296-308
24. Barker, J. E., Deveau, S., Lessard, M., Hamblen, N., Vogler, C. and Levy, B., (2001). In utero fetal liver cell transplantation without toxic irradiation alleviates lysosomal storage in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Blood Cells Mol Dis.* 27: 861-73

25. Casal, M. L. and Wolfe, J. H., (2001). In utero transplantation of fetal liver cells in the mucopolysaccharidosis type VII mouse results in low -level chimerism, but overexpression of beta -glucuronidase can delay onset of clinical signs. *Blood*. 97: 1625-34
26. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., et al., (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 272: 263-7
27. Sutton, R. E., Wu, H. T., Rigg, R., Bohnlein, E. and Brown, P. O., (1998). Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. *J Virol*. 72: 5781-8
28. Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I. and Williams, D. A., (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med*. 2: 876-82
29. Donahue, R. E., Sorrentino, B. P., Hawley, R. G., An, D. S., Chen, I. S. and Wersto, R. P., (2001). Fibronectin fragment CH -296 inhibits apoptosis and enhances ex vivo gene transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD34+ cells. *Mol Ther*. 3: 359-67
30. Miller, C. L. and Eaves, C. J., (1997). Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lymphoid-myeloid reconstituting ability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 13648-53
31. Albella, B., Segovia, J. C., Guenechea, G., Pragnell, I. B. and Bueren, J. A., (1999). Preserved long -term repopulation and differentiation properties of

- hematopoietic grafts subjected to ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin 11. *Transplantation*. 67: 1348-57
32. Bowie, M. B., Kent, D. G., Copley, M. R. and Eaves, C. J., (2007). Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells. *Blood*. 109: 5043-8
33. Matsunaga, T., Kato, T., Miyazaki, H. and Ogawa, M., (1998). Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6. *Blood*. 92: 452-61
34. Sitnicka, E., Lin, N., Priestley, G. V., Fox, N., Broudy, V. C., Wolf, N. S., et al., (1996). The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 87: 4998-5005
35. Yagi, M., Ritchie, K. A., Sitnicka, E., Storey, C., Roth, G. J. and Bartelmez, S., (1999). Sustained ex vivo expansion of hematopoietic stem cells mediated by thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 8126-31
36. Yonemura, Y., Ku, H., Lyman, S. D. and Ogawa, M., (1997). In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood*. 89: 1915-21
37. Adolfsson, J., Borge, O. J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., et al., (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 15: 659-69
38. Christensen, J. L. and Weissman, I. L., (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 14541-6

39. Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Buza-Vidas, N., Adolfsson, J. and Jacobsen, S. E., (2002). Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity*. 17: 463-72
40. Li, K., Chuen, C. K., Lee, S. M., Law, P., Fok, T. F., Ng, P. C., et al., (2006). Small peptide analogue of SDF -1alpha supports survival of cord blood CD34+ cells in synergy with other cytokines and enhances their ex vivo expansion and engraftment into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells*. 24: 55-64
41. Lam, A. C., Li, K., Zhang, X. B., Li, C. K., Fok, T. F., Chang, A. M., et al., (2001). Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. *Transfusion*. 41: 1567-76
42. Hayashi, S., Hsieh, M., Peranteau, W. H., Ashizuka, S. and Flake, A. W., (2004). Complete allogeneic hematopoietic chimerism achieved by in utero hematopoietic cell transplantation and cotransplantation of LLME-treated, MHC-sensitized donor lymphocytes. *Exp Hematol*. 32: 290-9
43. Renda, M. C., Fecarotta, E., Dieli, F., Markling, L., Westgren, M., Damiani, G., et al., (2000). Evidence of alloreactive T lymphocytes in fetal liver: implications for fetal hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 25: 135-41
44. Lindton, B., Markling, L., Ringden, O., Kjaeldgaard, A., Gustafson, O. and Westgren, M., (2000). Mixed lymphocyte culture of human fetal liver cells. *Fetal Diagn Ther*. 15: 71-8

45. Toivanen, P., Uksila, J., Leino, A., Lassila, O., Hirvonen, T. and Ruuskanen, O., (1981). Development of mitogen responding T cells and natural killer cells in the human fetus. *Immunol Rev.* 57: 89-105
46. Lindton, B., Markling, L., Ringden, O. and Westgren, M., (2003). In vitro studies of the role of CD3+ and CD56+ cells in fetal liver cell alloreactivity. *Transplantation.* 76: 204-9
47. Orlandi, F., Giambona, A., Messana, F., Marino, M., Abate, I., Calzolari, R., et al., (1996). Evidence of induced non -tolerance in HLA -identical twins with hemoglobinopathy after in utero fetal transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 18: 637-9
48. Westgren, M., Ringden, O., Eik -Nes, S., Ek, S., Anvret, M., Brubakk, A. M., et al., (1996). Lack of evidence of permanent engraftment after in utero fetal stem cell transplantation in congenital hemoglobinopathies. *Transplantation.* 61: 1176-9
49. Jerebtsova, M., Batshaw, M. L. and Ye, X., (2002). Humoral immune response to recombinant adenovirus and adeno -associated virus after in utero administration of viral vectors in mice. *Pediatr Res.* 52: 95-104
50. Morris, J. C., Conerly, M., Thomasson, B., Storek, J., Riddell, S. R. and Kiem, H. P., (2004). Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses to enhanced green and yellow fluorescent proteins after myeloablative conditioning. *Blood.* 103: 492-9
51. Stripecke, R., Carmen Villacres, M., Skelton, D., Satake, N., Halene, S. and Kohn, D., (1999). Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther.* 6: 1305-12

52. Izembart, A., Aguado, E., Gauthier, O., Aubert, D., Moullier, P. and Ferry, N., (1999). In vivo retrovirus -mediated gene transfer to the liver of dogs results in transient expression and induction of a cytotoxic immune response. *Hum Gene Ther.* 10: 2917-25
53. Heim, D. A., Hanazono, Y., Giri, N., Wu, T., Childs, R., Sellers, S. E., et al., (2000). Introduction of a xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model. *Mol Ther.* 1: 533-44
54. Lutzko, C., Omori, F., Abrams -Ogg, A. C., Shull, R., Li, L., Lau, K., et al., (1999). Gene therapy for canine alpha -L-iduronidase deficiency: in utero adoptive transfer of genetically corrected hematopoietic progenitors results in engraftment but not amelioration of disease. *Hum Gene Ther.* 10: 1521-32
55. Puig, T., Kadar, E., Limon, A., Cancelas, J. A., Eixarch, H., Luquin, L., et al., (2002). Myeloablation enhances engraftment of transduced murine hematopoietic cells, but does not influence long -term expression of the transgene. *Gene Ther.* 9: 1472-9
56. Rosenzweig, M., MacVittie, T. J., Harper, D., Hempel, D., Glickman, R. L., Johnson, R. P., et al., (1999). Efficient and durable gene marking of hematopoietic progenitor cells in nonhuman primates after nonablative conditioning. *Blood.* 94: 2271-86
57. Carter, R. F., Abrams -Ogg, A. C., Dick, J. E., Kruth, S. A., Valli, V. E., Kamel-Reid, S., et al., (1992). Autologous transplantation of canine long -term marrow culture cells genetically marked by retroviral vectors. *Blood.* 79: 356-64
58. Kang, E., Giri, N., Wu, T., Sellers, S., Kirby, M., Hanazono, Y., et al., (2001). In vivo persistence of retrovirally transduced murine long-term repopulating cells

is not limited by expression of foreign gene products in the fully or minimally myeloablated setting. *Hum Gene Ther.* 12: 1663-72

59. Kantoff, P. W., Flake, A. W., Eglitis, M. A., Scharf, S., Bond, S., Gilboa, E., et al., (1989). In utero gene transfer and expression: a sheep transplantation model. *Blood.* 73: 1066-73

60. Chan, J., Waddington, S. N., O'Donoghue, K., Kurat a, H., Guillot, P. V., Gotherstrom, C., et al., (2007). Widespread distribution and muscle differentiation of human fetal mesenchymal stem cells after intrauterine transplantation in dystrophic mdx mouse. *Stem Cells.* 25: 875-84

61. Guillot, P. V., Abass, O., Bassett, J. H., Shefelbine, S. J., Bou-Gharios, G., Chan, J., et al., (2008). Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first -trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. *Blood.* 111: 1717-25

62. Carrier, E., Lee, T. H., Busch, M. P. and Cowan, M. J., (1995). Induction of tolerance in nondefective mice after in utero transplantation of major histocompatibility complex-mismatched fetal hematopoietic stem cells. *Blood.* 86: 4681-90

63. Hayashi, S., Peranteau, W. H., Shaaban, A. F. and Flake, A. W., (2002). Complete allogeneic hematopoietic chimerism achieved by a combined strategy of in utero hematopoietic stem cell transplantation and postnatal donor lymphocyte infusion. *Blood.* 100: 804-12

64. Peranteau, W. H., Hayashi, S., Hsieh, M., Shaaban, A. F. and Flake, A. W., (2002). High -level allogeneic chimerism achieved by prenatal tolerance induction and postnatal nonmyeloablative bone marrow transplantation. *Blood.* 100: 2225-34

